

Alternatives Spleißen unter Hypoxie in humanen Endothelzellen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Diplom-Biologin

Katrin Kemmerer

aus Hanau

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referentin: Prof. Dr. M. Cristina Cardoso

Tag der Einreichung: 05.04.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2016

Darmstadt 2017

D 17

Danksagung

Prof. Dr. Beatrix Süß gilt mein ausdrücklicher Dank für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrem Labor durchführen zu können. Für die Gelegenheit an interessanten Tagungen und Konferenzen teilnehmen zu können, bin ich dankbar, ebenso für hilfreiche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Julia Weigand für die Überlassung des interessanten Themas. Ich danke für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft. Danke auch für das Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheiten die ich genießen durfte.

Frau Prof. Dr. Cristina Cardoso möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken. Unsere Gespräche haben mir immer neue, interessante Aspekte aufgezeigt.

Ich möchte mich außerdem bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Süß und Weigand für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken. Insbesondere danken möchte ich Britta Kluge, für ihre Mitarbeit an dem hnRNP DL Projekt sowie ihre moralische Unterstützung. Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Nona und Britta S. richten, die mich beide auf ihre ganz persönliche Weise begleitet haben.

Ein Dankeschön auch an die Arbeitsgruppe Cardoso für ihre Hilfsbereitschaft bei dem Umgang mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Sandra Fischer und Christopher Theiss danke ich für ihr Engagement und das wissenschaftliche Interesse während ihrer Bachelorarbeit und Hiwi-Zeit.

Mein Dank gilt auch meiner Familie für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Ein herzliches Dankeschön an Reiner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Und natürlich danke ich Till, der mich seit Jahren in allen Höhen und Tiefen unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Kemmerer, K. & Weigand, J.E.

Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing. *FEBS Lett* 588, 4784-90 (2014).

Kemmerer K., Weigand, J.E. and Suess B.

Synthetic Splicing and Alternative Splicing - Impact on Gene Design. *WILEY BIOTECHNOLOGY SERIE*

akzeptiert

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Hypoxie	2
2.1.1	Vorkommen und Relevanz von Hypoxie	2
2.1.2	Transkriptionelle Genregulation unter Hypoxie.....	3
2.1.3	Posttranskriptionelle Genregulation unter Hypoxie	4
2.2	Spleißen.....	5
2.3	Alternatives Spleißen	7
2.3.1	Regulation des alternativen Spleißens	8
2.3.2	Alternatives Spleißen und NMD	9
2.3.3	Alternatives Spleißen bei Krankheiten und Krebs	10
2.3.4	hnRNP DL.....	11
2.4	Alternatives Spleißen unter Hypoxie.....	14
2.5	MAX (MYC associated factor X).....	14
2.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Alternatives Spleißen von MAX unter Hypoxie	18
3.1.1	Hypoxie induziert den Anstieg zweier MAX Isoformen.....	18
3.1.2	MAX Isoform C wird durch den NMD-Mechanismus degradiert	22
3.1.3	Isoform E kodiert ein instabiles Protein	23
3.1.4	Lokalisierung von Wildtyp und Isoform E.....	26
3.1.5	Stabilisierungs- und Destabilisierungsdomänen in Wildtyp und Isoform E	27
3.1.6	Destabilisierungsdomäne in Isoform E.....	30
3.1.7	Abbaumechanismus von Isoform E.....	32
3.1.8	Funktionelle Bedeutung des unproduktiven Spleißens unter Hypoxie.....	33
3.2	Regulation von hnRNP DL	36
3.2.1	hnRNP DL beeinflusst die Proliferation in Endothelzellen	36
3.2.2	hnRNP DL Autoregulation	37
3.2.3	Crossregulation von hnRNP DL und hnRNP D	48
4	Diskussion.....	51
4.1	Alternatives Spleißen von MAX unter Hypoxie	51
4.1.1	MAX Isoform C wird durch den NMD degradiert	51
4.1.2	MAX Isoform E kodiert ein instabiles Protein	52
4.1.3	Funktionelle Bedeutung des unproduktiven Spleißens unter Hypoxie	54
4.1.4	Ausblick	56
4.2	Regulation von hnRNP DL	56

4.2.1	Die Rolle von hnRNP DL bei der Proliferation in Endothelzellen.....	56
4.2.2	hnRNP DL Auto- und Crossregulation	57
4.2.3	Ausblick	62
5	Material und Methoden	63
5.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	63
5.2	Pro- und Eukaryotische Stämme	68
5.3	Puffer und Medien	69
5.4	Oligonukleotide, siRNAs, Antikörper	70
5.5	Plasmide	72
5.6	Plasmid Konstruktion	74
5.6.1	pDL	74
5.6.2	pDLP	75
5.6.3	FLAG-MAX-Fusionen	75
5.6.4	HA-MAX-Fusionen	76
5.6.5	GFP-MAX-Fusionen	76
5.6.6	Luziferase-MAX-Fusionen.....	77
5.6.7	Template für <i>in vitro</i> Transkriptionen	77
5.6.8	hnRNP DL Minigene.....	77
5.6.9	hnRNP DL Überexpressionsplasmide pCMV-hnRNPDL und pCMV-hnRNPDLΔ6	78
5.6.10	Stabile Integration pFRT-GFP-hnRNPDL	79
5.6.11	hnRNP D	79
5.7	Methoden	80
5.7.1	Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen	80
5.7.2	Methoden zur Behandlung eukaryotischer Zellen	80
5.7.3	Allgemeine Methoden mit Nukleinsäuren	86
5.7.4	RNA-Präparation	88
5.7.5	cDNA-Synthese.....	89
5.7.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	89
5.7.7	<i>In vitro</i> Translation	91
5.7.8	Methoden mit Proteinen	91
5.7.9	RNA-Protein-Interaktionen (Pulldown)	92
6	Abkürzungsverzeichnis	94
7	Literaturverzeichnis	96
8	Lebenslauf	104
9	Publikationen und Tagungen	105
10	Ehrenwörtliche Erklärung	106

1 Zusammenfassung

Hypoxie spielt eine bedeutende Rolle in vielen pathologischen Prozessen wie bei vaskulären Erkrankungen oder auch Tumoren. Während die transkriptionelle Anpassung schon intensiv untersucht wurde, wurde der posttranskriptionellen Regulation bisher wenig Beachtung geschenkt. Insbesondere das alternative Spleißen eröffnet eine Möglichkeit der schnellen und sehr spezifischen Anpassung an sich ändernde Umgebungen. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei Gene untersucht, die beide unter Hypoxie in Endothelzellen alternativ gespleißt werden.

Das erste der beiden Gene ist der MYC assoziierte Faktor X (MAX), ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor in einem Netzwerk, das die Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert. MAX wurde als eines von neun alternativ gespleißten Genen in einem Exon Array identifiziert. Während Hypoxie die Expression anderer Mitglieder des Netzwerkes ändert, wurden bisher keine Änderungen in der MAX Expression gefunden. In Endothelzellen werden zwei MAX mRNA Isoformen induziert, die sich an ihrem 3' Ende vom Wildtyp unterscheiden. Isoform C wird durch den NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) abgebaut, während Isoform E für ein instabiles Protein mit einem veränderten C-Terminus kodiert. Diese Destabilisierung wird durch die Isoform E spezifische 36 aa lange Sequenz vermittelt, die auch in der Lage ist, heterologe Proteine durch Fusionieren an deren C-Terminus zu destabilisieren. Beide Spleißereignisse sind demnach unproduktiv und scheinen vielmehr der Reduktion des Wildtyps unter Hypoxie zu dienen.

Durch neuere Studien wurde gezeigt, dass deregulierte Spleißfaktoren zum Fortschreiten von Tumoren beitragen können. Um die Regulation solcher Proteine besser zu verstehen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit das alternative Spleißen des RNA bindenden Proteins hnRNP DL charakterisiert. Unter Hypoxie wird eine unproduktive mRNA Isoform durch Inklusion eines Exons im 3' UTR induziert, die durch Abbau im NMD zu einer geringeren Proteinmenge in Endothelzellen führt. Eine reduzierte Menge von hnRNP DL konnte mit einer reduzierten Proliferation in Endothelzellen assoziiert werden.

hnRNP DL ist in der Lage, das Spleißen der eigenen prä-mRNA zugunsten der NMD sensitiven Isoform zu verschieben. Diese Autoregulation ist mit einem ultrakonservierten Element verbunden und wurde bereits für mehrere Mitglieder der hnRNP Familie beschrieben. Durch Minigen-Analysen konnte die Bindesequenz von hnRNP DL auf 50 nt auf- oder abwärts des alternativen Exons eingegrenzt werden. Außerdem konnte eine gegenseitige Regulation der paralogen Proteine hnRNP D und DL in HeLa-Zellen bestätigt werden. Die Proteine regulieren somit die eigene sowie die gegenseitige Expression durch einen negativen *feedback loop*. Diese Art der Crossregulation ist auch für andere paraloge hnRNPs beschrieben worden, jedoch anders als hier gezeigt, keine Regulation in beide Richtungen.

2 Einleitung

2.1 Hypoxie

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung aller Zellen ist essentiell für ihre Vitalität. Sauerstoffmangel (Hypoxie) führt zu Veränderungen der Genexpression, um das Überleben unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen zu gewährleisten¹.

Man unterscheidet drei Arten von Gewebhypoxie². Die hypoxämische Hypoxie bezeichnet eine zu geringe Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut. Dies kommt bei Aufenthalten in Höhen von über 4000 m vor, da hier der Barometerdruck und damit auch der Sauerstoffpartialdruck in den Alveolen sinkt. Als zweites ist die anämische Hypoxie zu nennen, bei der die Sauerstofftransportkapazität herabgesetzt ist, was zum Beispiel durch einen geringen Hämoglobingehalt des Blutes hervorgerufen wird. Eine Ursache kann beispielsweise Eisenmangel sein, da Eisen zur Ausbildung des Porphyrinrings im Hämoglobin benötigt wird. Die dritte Form ist die ischämische Hypoxie, die bei verminderter Durchblutung des Gewebes, zum Beispiel durch Gefäßverengung oder -verschluss auftritt.

2.1.1 Vorkommen und Relevanz von Hypoxie

Hypoxie tritt in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese oder dem Wundheilungsprozess auf^{3,4}. Außerdem treten hypoxische Bereiche bei kardiovaskulären Erkrankungen auf. Hier kommt es durch Arteriosklerose, Thrombosen oder einen Herzinfarkt zu verminderter Durchblutung und damit zum Auftreten von lokaler ischämischer Hypoxie^{2,5}.

In soliden Tumoren tritt Hypoxie in Folge von proliferierenden Zellen auf, die dem Blutgefäßsystem entwachsen. Durch die hypoxische Umgebung wird in normalen sowie in Tumorzellen eine Zellantwort ausgelöst, die das Überleben ohne Sauerstoff sicherstellt (siehe auch Kapitel 2.1.2 und 2.1.3). Generell werden hypoxische Tumore mit einer schlechten Prognose assoziiert, weil Tumorzellen die Anpassungen ausnutzen, um Zell-Zell-Kontakte zu reduzieren, wodurch sich das Potential zur Metastasierung erhöht. Außerdem können hypoxische Tumore durch das Entwachsen aus dem Blutgefäßsystem oft nur eingeschränkt mit Medikamenten beliefert werden und sind deshalb oft resistent gegen Radio- und Chemotherapie⁶.

Eine besondere Rolle bei der Reaktion auf Hypoxie spielen Endothelzellen, die das Innere des gesamten Blutgefäßsystems auskleiden und verschiedenste Sauerstoffsensoren exprimieren, um auf Änderungen im Sauerstoffgehalt reagieren zu können⁷. Hypoxie steigert die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen, welche dann das Wachstum von neuen Gefäßen induzieren (Angiogenese), um die Versorgung des hypoxischen Gewebes mit Sauerstoff wiederherzustellen^{1,8}. Auch in der hypoxischen Umgebung von Tumoren wird die Neovaskularisation stimuliert, wodurch die Proliferation und damit das Tumorstadium gefördert wird. Eine Endothelzelle trägt damit zum Überleben von 50-100 Tumorzellen bei⁹. Weiterhin wird durch neue Blutgefäße auch eine Eintrittsstelle für Tumorzellen in den Blutkreislauf generiert. Hypoxie induzierte Änderungen der Genexpression tragen damit direkt zum Tumorstadium bei und sind deshalb interessant, um neue Angriffspunkte für die Bekämpfung von Tumoren zu identifizieren. Verwendet werden für Untersuchungen

in Kultur z.B. Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs – *human umbilical vein endothelial cells*). Diese Primärzellen sind ideal geeignet, da sie in Zellkultur ihre Eigenschaften und Charakteristika durch die sie *in vivo* gekennzeichnet sind beibehalten.

2.1.2 Transkriptionelle Genregulation unter Hypoxie

Um das Überleben unter Hypoxie sicherzustellen, müssen die Zellen ihre Genexpression anpassen. Am besten untersucht ist die transkriptionelle Antwort auf Hypoxie durch die Familie der HIF (*hypoxia inducible factor*) Transkriptionsfaktoren (Abb. 2.1)¹⁰. Der HIF-Komplex besteht aus einem Heterodimer, das aus zwei strukturell ähnlichen Untereinheiten gebildet wird. Dabei interagiert eine von drei sauerstofflabilen α -Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α) mit der konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (ARNT). Die Expressionsregulation der α -Untereinheiten erfolgt auf der Ebene der Proteinstabilität. Unter Normoxie (normale Sauerstoffversorgung) wird HIF- α durch Prolylhydroxylasen an konservierten Prolinresten hydroxyliert und damit für den Abbau im Proteasom markiert. Unter Hypoxie ist die Aktivität der Prolylhydroxylasen gehemmt, sodass HIF- α stabil bleibt, mit ARNT dimerisiert und die Transkription vieler Zielgene aktiviert. Gene, die direkt durch HIF reguliert sind, beinhalten unter anderem die Laktat-Dehydrogenase, die Phosphoglycerat-Kinase-1 und die Pyruvat-Dehydrogenase, welche die Umstellung auf die anaerobe Energiegewinnung vermitteln. Gleichzeitig wird die Proliferation vermindert, um den Energieverbrauch zu minimieren. Um den O₂ Transport zu erhöhen, wird die Produktion von EPO (Erythropoetin) zur Steigerung der Erythropoese induziert. Außerdem wird die Synthese von Wachstumsfaktoren wie VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) oder PDGFB (*platelet-derived growth factor B*) gesteigert, welches die Neubildung von Blutgefäßen stimuliert.

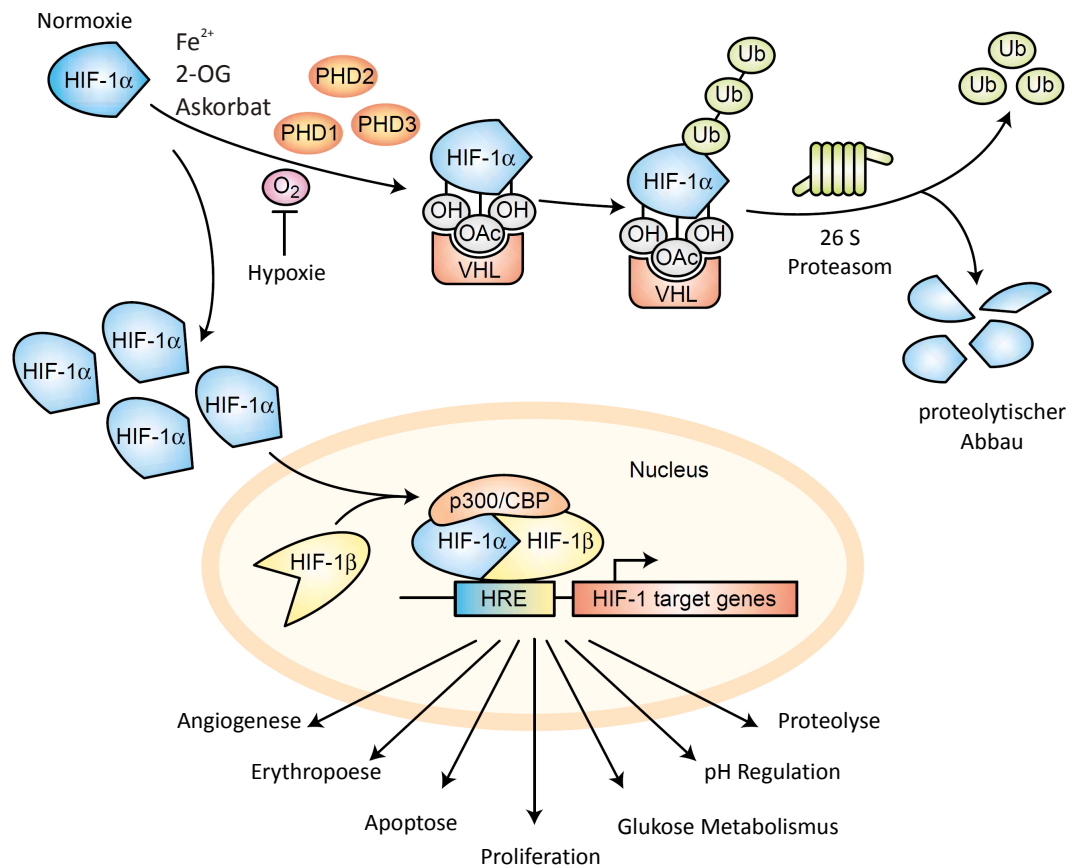


Abbildung 2.1 HIF abhängige Regulation unter Hypoxie

Erklärung siehe Text. 2-OG = 2-Oxoglutarat, CBP = CREB binding protein, HIF = hypoxia inducible factor, HRE = hypoxia responsible element, PHD = Prolylhydroxylasen, Ub = Ubiquitin, VHL = von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. Abbildung verändert nach¹¹.

2.1.3 Posttranskriptionelle Genregulation unter Hypoxie

In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass nicht die Transkription allein über die Expression eines Gens entscheidet, sondern auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von größter Bedeutung sind, dazu gehören die Stabilität der mRNAs sowie deren Translationseffizienz. Ein Beispiel ist das RNA bindende Protein HuR (*human antigen R*), welches selbst unter Hypoxie induziert wird. Es kann sowohl an den 5' UTR von *HIF-1α* binden und damit die Translationseffizienz erhöhen¹², als auch an den 3' UTR von *VEGFA*, um die mRNA zu stabilisieren¹³. Dadurch kann es die Antwort auf Hypoxie zunächst verstärken. In einem weiteren Schritt hilft es wiederum, die Antwort auf Hypoxie zu beenden, indem es das Level von pVHL (von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein) erhöht, welches seinerseits HIF-1α für den Abbau markiert¹⁴.

Weitere RNA bindende Proteine, die an der Regulation unter Hypoxie beteiligt sind, sind hnRNP I (auch PTB, *polypyrimidine-tract-binding protein*)^{12,15} oder TTP (*Tristetraprolin*)^{16,17}. Auch miRNAs tragen zu einer Regulation unter Hypoxie bei. MiR-210 wird HIF abhängig induziert und reguliert Gene des Metabolismus, der Proliferation und der Angiogenese^{18,19}. Hingegen ist bisher nur sehr wenig über Hypoxie induzierte Änderungen des Spleißens in der Zelle bekannt (Kapitel 2.3).

2.2 Spleißen

Die prä-mRNAs (*precursor messenger mRNA*) eukaryotischer Gene bestehen aus Exons und Introns, wobei die Exons Bestandteil der reifen mRNA sind. Durch das Spleißen werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt, sodass eine translationsfähige mRNA entsteht. Das Spleißen wird vom Spleißosom, einem Ribonukleoprotein-Komplex katalysiert. Als Erkennungsstelle enthalten Introns das Dinukleotid GU an der 5' Spleißstelle (5' SS), welches innerhalb der Konsensussequenz GURAGU liegt. Das 3' Ende hingegen ist durch drei konservierte Sequenzelemente charakterisiert. Dazu zählt die Verzweigungsstelle (*branch point*), ein Adenosin, ca. 18-40 nt aufwärts der 3' Spleißstelle (3' SS), der Polypyrimidintrakt und ein terminales AG Dinukleotid am Ende der 3' SS²⁰. Die Reaktion erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifikationen (Abb. 2.2). Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2' OH Gruppe des Adenosins der Verzweigungsstelle auf die 5' SS. Dies führt zur Ligation des 5' Endes des Introns mit der 2' OH Gruppe des Adenosins. Im zweiten Schritt greift das frei gewordene 3' OH der 5' SS das Phosphat der 3' SS an. Das Resultat sind zwei verknüpfte Exons sowie das freigesetzte Intron in Lariat-Struktur²⁰.

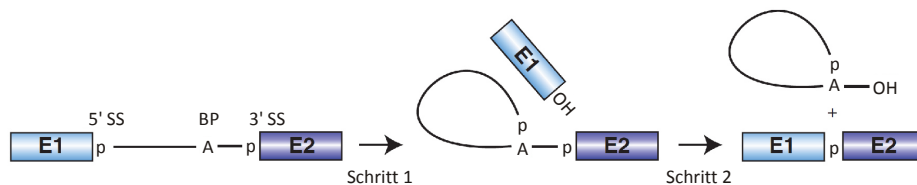


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Transesterifikationen während des Spleißprozesses

Die zwei Exons sind als Boxen dargestellt (E1 und E2), das dazwischenliegende Intron als Linie. Die benötigten Elemente sind wie folgt gekennzeichnet: 5' Spleißstelle (5' SS), Verzweigungsstelle (BP), 3' Spleißstelle (3' SS), freie Hydroxylgruppe (OH), Phosphat-Gruppe (p). Abbildung verändert nach²⁰.

Das Spleißosom ist ein dynamischer, makromolekularer Ribonukleoprotein-Komplex und setzt sich aus einer Vielzahl von Faktoren zusammen, die mit der prä-mRNA interagieren und dadurch die reaktiven Gruppen der prä-mRNA in räumliche Nähe bringen. Bestandteile des Spleißosoms sind die sogenannten snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) U1, U2, U5 und U4/6. Jedes snRNP besteht aus einer oder zwei snRNAs (*small nuclear ribonucleic acids*), je sieben Sm-Proteinen und einer variablen Anzahl weiterer snRNP spezifischer Proteine. Außerdem ist eine große Zahl weiterer Proteine beteiligt. Der Spleißprozess ist ein dynamischer Vorgang, bei dem Umlagerungen in der Struktur und der Zusammensetzungen des Spleißosoms stattfinden (Abb. 2.3)²⁰.

Im ersten Schritt interagiert das U1 snRNP durch Basenpaarung über die U1 snRNA mit der 5' SS. Das Adenosin der Verzweigungsstelle wird von SF1 (*splicing factor 1*) gebunden, U2AF (*U2 auxiliary factor*) bindet den Polypyrimidin-Trakt und die 3' SS. Im nächsten Schritt bindet das U2 snRNP an den Verzweigungspunkt und bildet den A Komplex. Dann wird das vorassemblierte tri-snRNP, bestehend aus U4/U5/U6 an den Komplex geleitet und es bildet sich der präkatalytische B Komplex. Durch größere Umlagerungen der RNA-RNA und RNA-Protein Interaktionen löst sich die Bindung von U1 und U4, wodurch der katalytisch aktive B Komplex entsteht, der den ersten Schritt der Katalyse vollzieht. Der zweite Schritt findet in dem daraus entstandenen Komplex C statt. Das Spleißosom wird unter ATP-Verbrauch aufgelöst und für die nächste Runde recycelt²⁰.

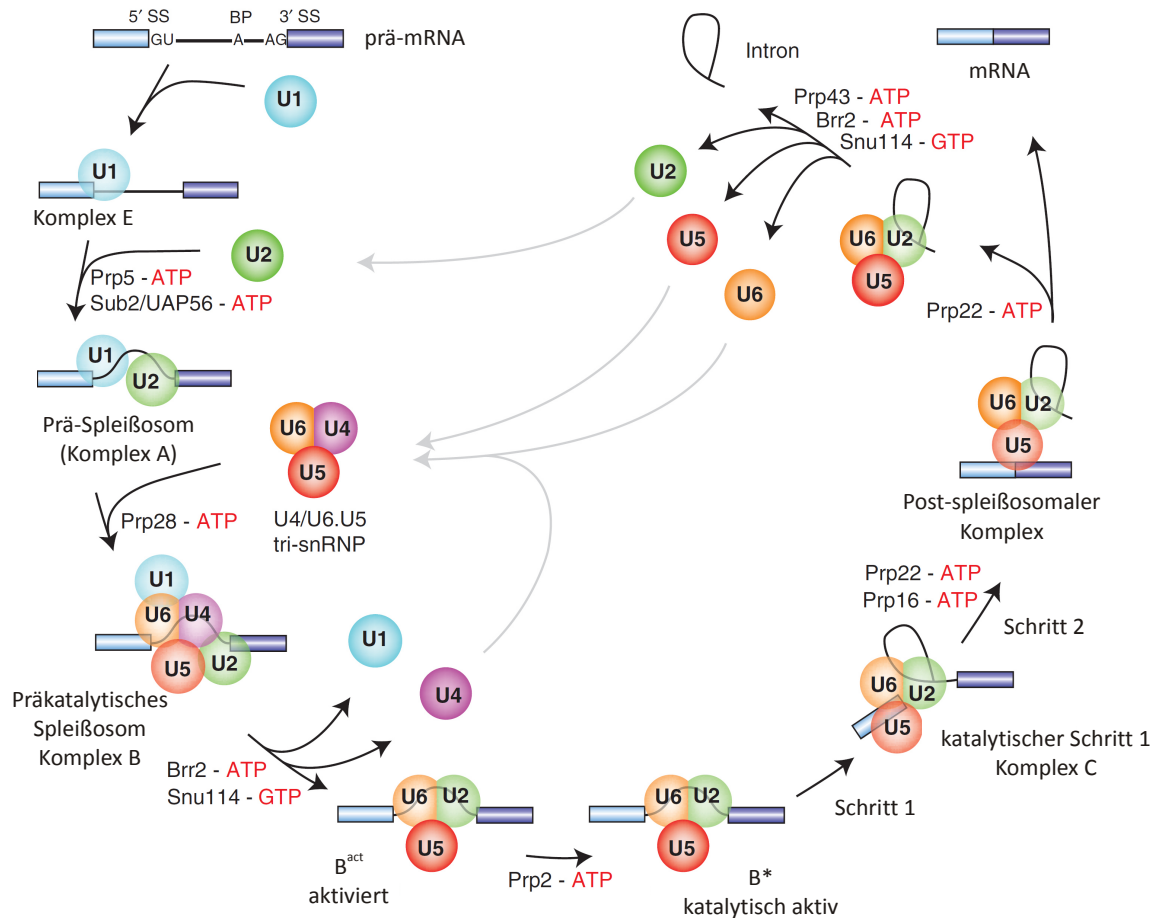
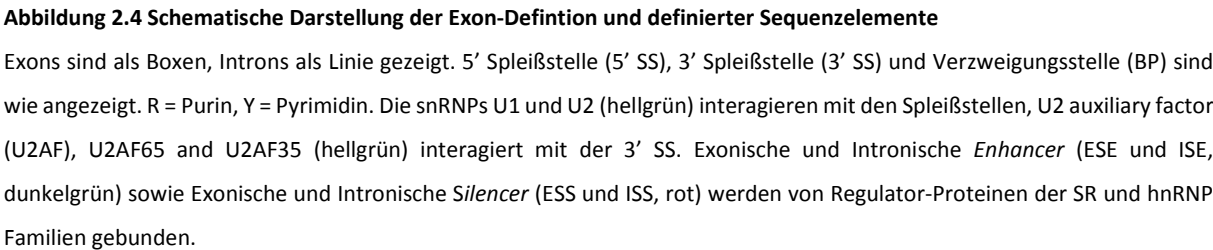


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen des Spleißosoms während des Spleißprozesses
Gezeigt sind die snRNPs (Kreise), sowie die Exons (Boxen) und Intron (Linie). Erklärung siehe Text. Abbildung verändert nach²⁰.

Wenn Introns länger sind als 200-250 nt, was der Fall für die meisten Introns in höheren Eukaryoten ist, bildet sich ein erster Komplex über das Exon, ein Prozess, der als Exon-Definition bezeichnet wird²¹. Dabei bindet das U1 snRNP an die 5' SS abwärts des Exons und rekrutiert U2AF an den Polypyrimidin-Trakt aufwärts der 3' SS (Abb. 2.4). Dies führt zur Anlagerung des U2 snRNPs an die Verzweigungsstelle aufwärts des Exons. Dieser Komplex wird stabilisiert durch Proteine der SR Familie, die an *Enhancer* Elemente innerhalb des Exons binden. Um den Spleißprozess durchzuführen, muss der Exon-definierte Komplex zunächst in einen Intron definierten A Komplex umgewandelt werden²².



Beim alternativen Spleißen (AS) werden verschiedene mRNAs ausgehend von einem Gen produziert. AS kommt in 95% aller multi-exonischen, humanen Gene vor und erhöht dadurch die Proteinvelfalt^{23,24}. Dies spielt eine zentrale Rolle in der Zelltyp und Gewebe spezifischen Expression bestimmter Gene, sodass Isoformen mit veränderter DNA-Bindung, einer geänderten Lokalisation oder einer unterschiedlichen mRNA-Stabilität exprimiert werden können²⁵.

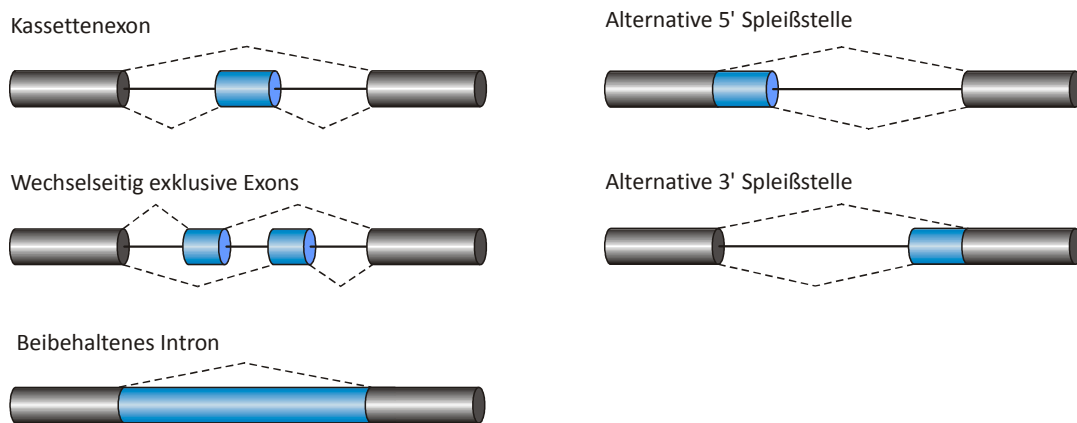


Abbildung 2.5 Übersicht der verschiedenen Arten des alternativen Spleißens

Bei Kassettenexons handelt es sich um Exons, die entweder in der reifen mRNA inkludiert oder exkludiert werden können. Bei wechselseitig exklusiven Exons ist nur eins der beiden Exons in der reifen mRNA enthalten. Durch konkurrierende 5' oder 3' Spleißstellen können Exons verlängert oder verkürzt werden. Ein beibehaltenes Intron wird nicht heraus gespleißt und ist Teil der reifen mRNA.

2.3.1 Regulation des alternativen Spleißens

Alternative Exons weisen dieselben konservierten Bereiche wie konstitutive Exons auf, unterscheiden sich jedoch in der Stärke ihrer Spleißstellen. Ausschlaggebend ist dabei beispielsweise die Übereinstimmung der Sequenz der 5' SS mit der Konsensussequenz GURAGU (Abb. 2.4), je stärker die Abweichung zu dieser Sequenz, desto schwächer die Spleißstelle. Alternative Exons weisen meist eine schwächere 5' SS auf, außerdem sind sie kürzer und der Verzweigungspunkt liegt weiter stromaufwärts²⁸. Um einen korrekten Ablauf des Spleißens zu garantieren, sind weitere RNA-Sequenzelemente und RNA bindende Proteine nötig. Die Spleiß-regulatorischen Elemente (SRE) werden dabei nach ihrer Funktion und Position kategorisiert. Sequenzen, die das Spleißen fördern, werden als *exonic splicing enhancer* oder *intronic splicing enhancer* (ESE oder ISE) bezeichnet. Sequenzen, die das Spleißen inhibieren, werden äquivalent als *exonic splicing silencer* oder *intronic splicing silencer* (ESS oder ISS) bezeichnet²⁹. Diese SREs werden hauptsächlich von zwei Proteinfamilien gebunden, den SR Proteinen (Serin/Arginin reiche Proteine) und den Mitgliedern der hnRNP Familie (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*).

Proteine der SR Familie besitzen eine oder zwei N-terminale *RNA recognition motifs* (RRM) sowie die namensgebende RS Domäne, eine Folge von Arginin/Serin-Dipeptiden am C-Terminus. Zu den kanonischen SR Proteinen zählen die 12 Mitglieder SRSF1-12. Sie sind hauptsächlich am konstitutiven und alternativen Spleißen beteiligt, aber sie üben auch weitere Funktionen im RNA Metabolismus aus und sind auch an der Transkription, am mRNA Export und der Translation beteiligt. Die dynamische Phosphorylierung an Serinresten in der RS-Domäne ist dabei die Grundlage für ihre Aktivität³⁰.

Eine weitere Familie von Spleißfaktoren sind die hnRNPs. Diese funktionell heterogene Gruppe von Proteinen ist gekennzeichnet durch eine oder mehrere RRM-Domänen oder eine K Homology (KH)-type RNA bindende

Domäne³¹. Außerdem können sie weitere Domänen wie RGG-Boxen (Wiederholungen des Tripeptids Arg-Gly-Gly), Glycin-reiche, saure- oder Prolin-reiche Domänen enthalten. Viele hnRNPs pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma, um ihre vielfältigen Funktionen auszuüben³². Neben ihrer Funktion beim Spleißen beteiligen sie sich auch an der Transkription³³, der mRNA Stabilität³⁴, dem mRNA Export³⁵ und der Translation³⁶.

SR Proteine sind sowohl am konstitutiven als auch am alternativen Spleißen beteiligt. Beim konstitutiven Spleißen begünstigen SR Proteine den Spleißprozess, indem sie die Erkennung der Spleißstellen erleichtern und Komponenten des Spleißosoms an die prä-mRNA rekrutieren, dazu zählt beispielsweise die Rekrutierung des U1 snRNPs an die 5' SS. Ihre Funktion im alternativen Spleißen üben sie durch die Interaktion mit *Silencer* oder *Enhancer* Elementen der prä-mRNA aus, dabei findet eine positionsabhängige Regulation statt. Bei Bindung im Exon aktivieren sie das Spleißen, während sie als *Silencer* agieren, wenn die Bindung im Intron stattfindet. hnRNPs hingegen zeigen eine gegenläufige Regulation und üben einen negativen Einfluss auf den Spleißprozess aus, wenn sie innerhalb des Exons binden, und agieren als *Enhancer*, bei Bindung im Intron³⁷.

Die Entscheidung, ob ein Exon gespleißt wird oder nicht, hängt nicht nur von einem Spleißfaktor ab, sondern wird in einer kombinatorischen Weise entschieden, dazu zählt auch das Vorhandensein verschiedener Spleißfaktoren zum gegebenen Zeitpunkt. Die Inhibierung des Spleißprozesses kann auf vielseitige Weise erfolgen. Ein Weg ist die Inhibition der Anlagerung des Spleißosoms oder positiver Regulatoren durch sterische Hinderung. Weitere Möglichkeiten sind die Multimerisierung von Spleißfaktoren entlang von Exons, die dadurch ebenfalls die Bindung weiterer Faktoren beeinflussen. Bei dem sogenannten „Looping Out“ Mechanismus, bei dem zwei intronisch gebundene Spleißfaktoren miteinander interagieren, wird das dazwischenliegende Exon ausgeschlossen und die Spleißstellen der umliegenden Exons in räumliche Nähe gebracht³⁸.

2.3.2 Alternatives Spleißen und NMD

AS dient nicht nur zur Erhöhung der Proteindiversität, sondern kann auch genutzt werden, um die Proteinmenge zu reduzieren. Die gebildete mRNA wird dabei nicht translatiert, sondern in dem *nonsense mediated decay*, kurz NMD abgebaut³⁹. NMD ist ein RNA-Überwachungsmechanismus, der mRNAs mit einem vorzeitigen Terminationssignal (PTC, *premature termination codon*) abbaut, um verkürzte oder fehlerhafte Proteine zu vermeiden⁴⁰. PTCs können durch Mutationen auf DNA-Ebene entstehen oder durch Fehler bei der Transkription oder der prä-mRNA Prozessierung. Auch natürliche Terminationssignale können als vorzeitig erkannt werden, wenn sie >50-55 nt aufwärts eines Exon-Junction-Komplexes liegen⁴¹. Bei dem Exon-Junction-Komplex handelt es sich um einen Proteinkomplex, der nach dem Spleißen ca. 20 nt stromaufwärts der Exon-Exon-Grenze auf der mRNA gebunden bleibt, demnach können Exons im 3' UTR die mRNA für den NMD markieren. In der ersten Runde der Translation wird am Terminationssignal durch die Interaktion von Ribosom assoziierten Proteinen mit Proteinen des Exon-Junction-Komplexes entschieden, ob die mRNA degradiert wird. Als wichtigste Faktoren sind dabei UPF (*up-frameshift*) Proteine zu nennen⁴⁰. Der Mechanismus wird außerdem genutzt, um durch AS PTCs in die mRNAs einzubringen, die dann degradiert werden, der Vorgang wird als AS-NMD bezeichnet. Somit wird eine quantitative posttranskriptionelle Regulation ermöglicht⁴².

Nach diesen Regeln würden 1/3 aller humanen alternativen mRNA Isoformen in der RefSeq Datenbank Ziele für den NMD darstellen⁴³. Jedoch konnte diese Zahl durch genomweite Analysen nach einem UPF1 *knockdown*

widerlegt werden^{44,45}. Auch wenn der Mechanismus nicht so weit verbreitet ist, wie ursprünglich angenommen, gibt es einige Proteinfamilien, die den AS-NMD nutzen, um die eigene Expression kontrollieren zu können. Dazu zählen vor allem Proteine der SR und hnRNP Familien^{46,47}.

Das PTC kann dabei auf unterschiedliche Weise in die mRNA eingebracht werden. Entweder enthalten die mRNAs ein sogenanntes *poison* Exon (z.B. SRSF3 und hnRNP L), welches bei Beibehalten oder bei Herausspleißen des Exons ein Stopcodon in die mRNA einführt. Auch ein alternatives Exon im 3' UTR (z.B. hnRNP D oder SRSF2), kann die mRNA durch den zusätzlichen Exon-Junction-Komplex hinter dem natürlichen Stopcodon für den NMD markieren⁴¹. Oft sind diese NMD-Spleißereignisse in SR Proteinen und hnRNPs an ultrakonservierte Elemente gekoppelt. Dabei handelt es sich um genomische Sequenzen, die länger als 200 bp sind und in den Organismen Mensch, Maus und Ratte zu 100% konserviert sind⁴⁸. AS-NMD wird dabei als ein Mechanismus zur Homöostase der Spleißfaktoren genutzt^{46,48}. Außerdem wurde gezeigt, dass diese Proteine oft in einem autoregulatorischen negativen *feedback loop* das Spleißen der eigenen prä-mRNA regulieren, um dadurch die Proteinmenge zu reduzieren. Dazu zählen beispielsweise SRSF2⁴⁹, SRSF7⁵⁰, SRSF3⁵¹, Tra2 β ⁵², hnRNP D⁵³ und hnRNP A2/B1⁵⁴. Auch Crossregulationen zwischen verwandten Mitgliedern wie PTB/nPTB und hnRNP L/hnRNP LL sind üblich und führen zu einer reziproken Expression der Proteine^{55,56}.

2.3.3 Alternatives Spleißen bei Krankheiten und Krebs

Fehler beim Spleißen sind oft Ursache von Krankheiten und sind am Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt^{57,58}. Mindestens 15% aller menschlichen Krankheiten sollen auf fehlreguliertem Spleißen aufgrund von Punktmutationen in den Konsensussequenzen der Spleißstellen herrühren. Es wird geschätzt, dass bis zu 50% der krankheitsauslösenden Mutationen in Exons das Spleißen beeinträchtigen⁵⁹. Durch Mutationen kommt es zum Auslassen von Exons oder es werden vorzeitige Stopcodons in die mRNA eingeführt, was zu nicht-funktionalen Proteinen oder einer fehlenden Expression führt. Krankheiten, die durch aberrantes Spleißen entstehen, sind die zystische Fibrose oder Alzheimer^{58,60}.

Ein weiteres Beispiel ist die spinale Muskelatrophie, eine neurodegenerative Erkrankung, bei deren Verlauf es zu einem Verlust von Alpha-Motoneuronen im Rückenmark kommt. Eine stille Mutation in einem ESE führt zu dem Ausschluss von Exon 7 in der *SMN2* mRNA. Dadurch wird kein funktionales SMN (*survival motor neuron*) Protein mehr gebildet⁶¹. Als Therapie wurden Antisense Oligonukleotide (ASOs) entwickelt, die ein abwärts gelegenes ISS maskieren und dadurch den Einschluss von Exon 7 fördern, was die Menge an SMN erhöht⁶². ASOs sind Oligonukleotide, die an ausgewählten Stellen mit der prä-mRNA durch Basenpaarung interagieren und dadurch das Spleißverhalten beeinflussen⁶³.

Aberrante Spleißereignisse fördern auch die Proliferation von Tumorzellen, oder sie vermitteln Therapie-Resistenz. Oft sind solche Ereignisse auch mit der deregulierten Expression von Spleißfaktoren verbunden. Spleißfaktoren regulieren das Spleißen vieler Gene und können das Gleichgewicht der produzierten mRNA Isoformen verschieben, wenn sie zu hoch oder zu niedrig exprimiert sind. Ein Beispiel ist der Spleißfaktor SRSF1, der in vielen Krebsarten wie Lungen-, Brust oder Darmkrebs überexprimiert wird⁶⁴. Diese Überexpression entsteht durch eine MYC abhängige, transkriptionelle Aktivierung oder eine Runterregulierung des unproduktiven Spleißens im AS-NMD. SRSF1 fördert die Bildung von anti-apoptotischen Spleißvarianten

verschiedener Apoptose Regulatoren wie BIM (*BCL2-like 11 protein*) und BCL2L1 (*B-cell lymphoma-2 Like-1*). Die Hochregulierung von SRSF1 selbst kann durch den Spleißfaktor Sam68 erfolgen, der den Abbau von SRSF1 im AS-NMD-Mechanismus reprimiert. Das AS ist dabei abhängig von dem Phosphorylierungsstatus von Sam68, der wiederum durch den ERK 1/2 Weg reguliert wird. Dadurch sind extrazelluläre Signale direkt mit aberrantem Spleißen in Krebs verbunden⁶⁵. Dieses Beispiel zeigt, dass ein fehlregulierter Spleißfaktor nicht nur die eigenen Zielgene beeinflussen kann, sondern durch Crossregulation auch die weiteren Spleißfaktoren beeinflusst werden können. Durch die Analyse dieser Regulationsmechanismen kann auch ein besseres Verständnis für das Fortschreiten von Krebserkrankungen entstehen.

2.3.4 hnRNP DL

Merkmale und Charakterisierung

Bei hnRNP DL (auch JKTBP1) handelt es sich um ein Mitglied der hnRNP Familie. Es besitzt zwei RRM-Domänen sowie eine Glycin- und Tyrosin-reiche Domäne am C-Terminus und ist ubiquitär exprimiert^{66,67}. Benannt wurde es nach dem gut charakterisierten hnRNP D (auch AUF1), mit dem es eine 74%ige aa-Identität der RNA bindenden Domänen aufweist⁶⁷. Außerdem ist die Struktur der Exon-Anordnung sehr ähnlich (Abb. 2.6). Beide Gene weisen außerdem ein Kassettenexon in ihrem 3' UTR auf, Exon 8 in hnRNP DL und Exon 9 in hnRNP D. Durch zwei unterschiedliche Transkriptionsstarts entstehen zwei Proteinisoformen, eine mit kurzem N-Terminus (hnRNP DL, siehe Pfeil in Abb. 2.6), eine mit langem N-Terminus. Eine dritte Isoform enthält den kurzen N-Terminus, aber kein Exon 6. Alle Isoformen sind im Nukleus lokalisiert, hnRNP DL und hnRNP DLΔ6 können zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln⁶⁸.

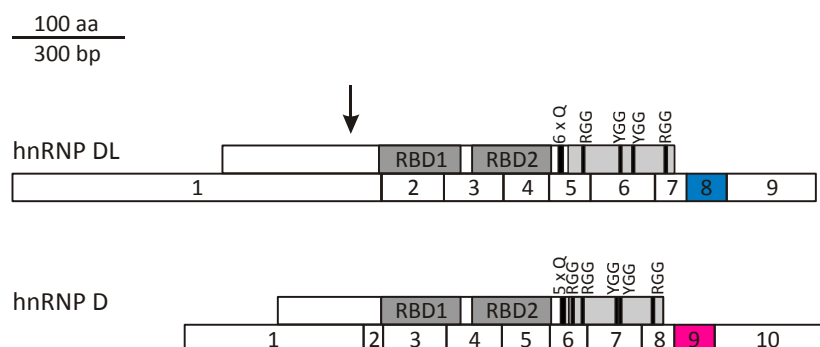


Abbildung 2.6 Schematische Übersicht über die Organisation von hnRNP DL und hnRNP D

Gezeigt sind die beiden verwandten Proteine hnRNP DL und hnRNP D. Der jeweils obere Teil zeigt die Proteinstruktur, im unteren Teil sind die Exons abgebildet. Beide Gene enthalten ein alternatives Exon im 3' UTR, Exon 8 in hnRNP DL (blau) und Exon 9 in hnRNP D (rot). Weitere alternative Exons sind Exon 6 in hnRNP DL sowie Exon 2 und Exon 7 in hnRNP D. Dunkelgrau sind die RNA bindenden Domänen (RBD), die GY-reiche Region ist in hellgrau gezeigt, schwarze Boxen innerhalb kennzeichnen 5-6 Glutamine (6x Q), RGG und YGG Tripeptide. Der Pfeil in hnRNP DL zeigt den Translationsstart der 301 aa langen Isoform (hnRNP DL) innerhalb der gezeigten 420 aa langen Isoform. Abbildung verändert nach⁶⁷.

Medizinische Bedeutung

hnRNP DL wird überexprimiert in Prostatakrebs und chronischer myeloischer Leukämie und fördert die Proliferation dieser Tumorzellen^{69,70}. Kürzlich wurden zwei Punktmutation innerhalb der Glycin-reichen Domäne (Exon 6) mit der Krankheit Gliedergürteldystrophie (*limb girdle muscular dystrophy*) assoziiert⁷¹. Bei Gliedergürteldystrophie handelt es sich um eine erbliche Muskelerkrankung, bei der Lähmungen der Muskulatur des Schulter- und Beckengürtels auftreten. Beide Punktmutationen betreffen dasselbe Nukleotid und führen jeweils zu einem aa-Austausch D378N bzw. D378H.

Zielgene und Bindepräferenzen von hnRNP DL

Bisher wurde erst ein endogenes Ziel von hnRNP DL bestätigt. Durch Reboll *et al.* wurde hnRNP DL als *Enhancer* der IRES abhängigen Translation der NF- κ B-repressing factor (NKRF)-mRNA identifiziert⁷². Außerdem wurde gezeigt, dass hnRNP DL im 3' UTR der NKRF mRNA bindet und dadurch ihre Stabilität erhöht⁷³. NKRF ist ein Transkriptionsfaktor, der die basale Transkription verschiedener Zytokin-Gene wie Interferon- β , Interleukin-8 oder der induzierbaren Stickoxid-Synthase inhibiert⁷⁴⁻⁷⁶.

Im Zusammenhang mit AS wurde ein Einfluss von hnRNP DL auf das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV-16) gezeigt. HPV ist eine der häufigsten durch Geschlechtsverkehr übertragenen Infektionen. Bei Typ 16 handelt es sich um einen Hochrisikotypen, der mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zervixkarzinom induziert⁷⁷. hnRNP DL bindet an ein ESS, welches die Bindesequenz AUAGUA enthält, und verhindert dadurch die Benutzung der 5' SS, wodurch die Produktion des *late gene L1* reduziert wird⁷⁸. Diese Inhibierung könnte HPV-16 helfen, sich vor dem Immunsystem zu verstecken, und damit eine langanhaltende Infektion mit erhöhtem Krebsrisiko ermöglichen.

Im Zusammenhang mit einer transkriptionellen Regulation wurde hnRNP DL in Mauszellen bei der Muskeldifferenzierung identifiziert. Maus und humanes hnRNP DL unterscheiden sich lediglich durch 1 aa innerhalb der GY-reichen Region (human: T216, Maus: A216)⁷⁹. Durch eine 10fache Induktion von hnRNP DL in Myotuben wird die Expression von COX Vb (Cytochrom C Oxidase Vb) aktiviert, dabei findet am Promotor von COX Vb ein Umschalten verschiedener Proteinfaktoren statt. Während in Myoblasten ZBP-89 und YY-1 die Transkription von COX Vb reprimieren, wird in Myotuben YY1 durch hnRNP DL ersetzt, wodurch die Transkription erhöht wird⁸⁰.

Um die Bindepräferenz von hnRNP DL zu untersuchen, gibt es einige *in vitro* basierte Studien. Durch SPR Experimente von Wang *et al.* wurde eine bevorzugte Bindung an die Sequenz AGUAGG gezeigt⁸¹. In einer *in vitro* Selektion mit 20 nt langen randomisierten Sequenzen wurde die spezifische Bindesequenz ACUAGC gefunden⁸². Außerdem konnte gezeigt werden, dass hnRNP DL an PolyG und PolyA sowie einzel- und doppelsträngige DNA bindet⁶⁶.

Diese identifizierten Bindesequenzen zeigen keine übereinstimmende Bindepräferenz für hnRNP DL. Auch bei einem Vergleich der Sequenzen mit den bekannten Präferenzen von hnRNP D wird keine Übereinstimmung gefunden. hnRNP D ist bekannt dafür an AU-reiche Elemente im 3' UTR zu binden und destabilisiert dadurch die Ziel-mRNAs⁸³.

hnRNP DL unter Hypoxie

hnRNP DL enthält ein Kassettenexon (Exon 8) im 3' UTR. Ein Anstieg der Isoform mit Exon 8 wurde in HUVECs nach einer Behandlung mit CoCl_2 als Hypoxie-Mimik festgestellt⁸⁴. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich diesen Anstieg ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen (1% O_2) in HUVEC bestätigen (Abb. 2.7 B). Ich konnte zeigen, dass diese Isoform ein Ziel für den Abbau im NMD-Mechanismus darstellt und dadurch zu einer reduzierten Proteinmenge führt⁸⁵. Dazu wurden die Endothelzellen zum einen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt, zum anderen wurde ein transienter *knockdown* des NMD-Faktors UPF1 durchgeführt. Nach beiden Behandlungen steigt Isoform 8/9, während Isoform 7/9 unverändert bleibt (Abb. 2.7 D und E). Durch den Abbau der mRNA für Isoform 8/9, reduziert sich die Proteinmenge von hnRNP DL unter Hypoxie (Abb. 2.7 C).

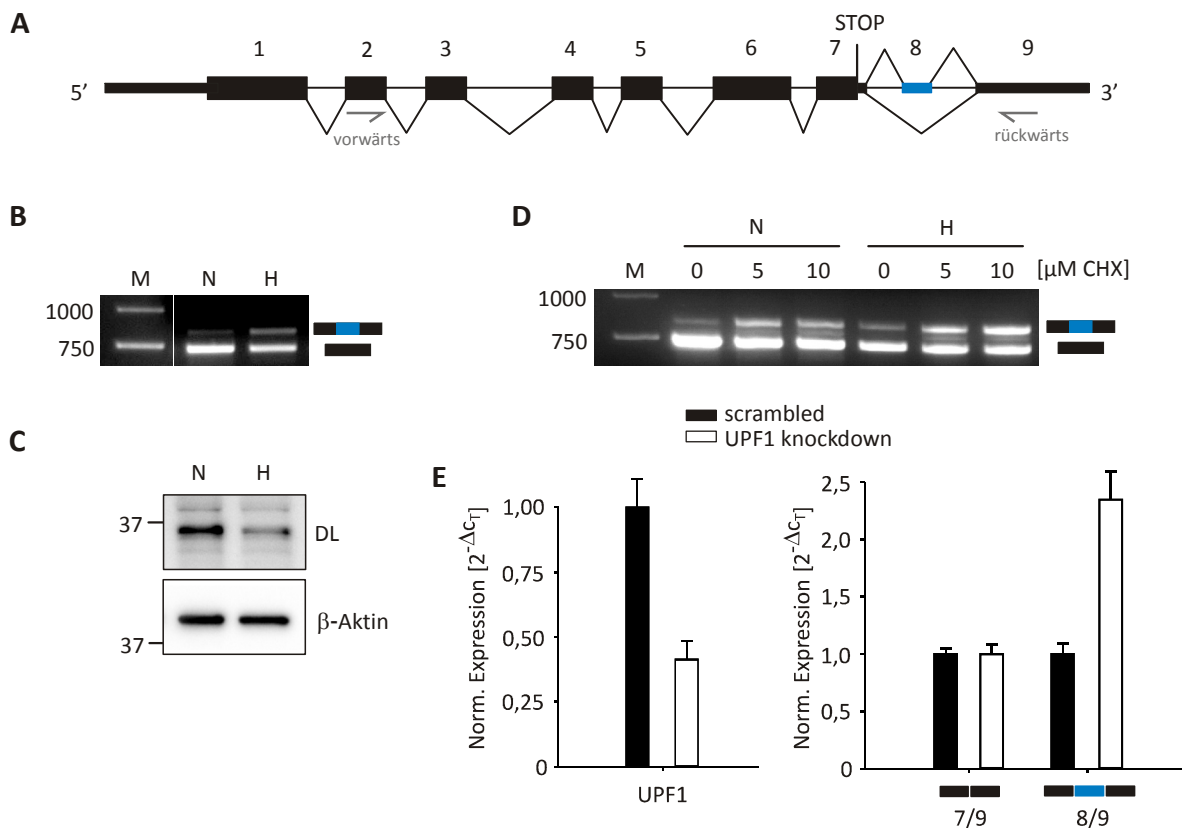


Abbildung 2.7 Alternatives Spleißen von hnRNP DL in HUVEC unter Hypoxie

A Schematische Darstellung der Genorganisation von hnRNP DL. Große Boxen sind kodierende Exons, kleine Boxen sind nichtkodierende Exons, Striche sind Introns, das Kassettenexon im 3' UTR ist blau dargestellt. **B** RT-PCR von hnRNP DL in HUVECs unter Normoxie (N) und Hypoxie (H). Die Lage der Oligonukleotide ist in Abbildung A angegeben. M = DNA-Größenmarker in bp. **C** Western Blot von hnRNP DL (DL) in HUVECs unter Normoxie (N) und Hypoxie (H), β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Größenangabe in kDa. **D** RT-PCR von hnRNP DL nach Cycloheximid-Behandlung (CHX) für 8 h mit den angegebenen Konzentrationen bei Normoxie (N) und Hypoxie (H). Die Lage der Oligonukleotide ist in Abbildung A angegeben. M = DNA-Größenmarker in bp. **E** qPCR nach transientem UPF1 *knockdown* in HUVEC. Quantifizierung der mRNA-Mengen von *UPF1* (links), sowie der Isoformen 7/9 und 8/9 (rechts). Die Werte wurden auf *RPLP0* normalisiert. Daten entnommen aus⁸⁵.

2.4 Alternatives Spleißen unter Hypoxie

Es ist bereits für einige Gene und in verschiedensten Zelltypen gezeigt worden, dass Hypoxie das Transkriptom durch eine Änderung des alternativen Spleißens moduliert⁸⁶⁻⁸⁸. Jedoch ist bisher der Einfluss der Spleißregulation auf die Gen- oder Zellfunktion noch kaum untersucht.

Ein Beispiel ist die HIF-gesteuerte Induktion von SF3B1 (*splice factor 3B subunit 1*), einem konstitutiven Bestandteil des Spleißosoms, die zum AS der Ketohexokinase in Kardiomyozyten führt. Dadurch wird der Fructose Metabolismus gesteigert, was wiederum zu pathologischem kardialen Wachstum beiträgt⁸⁹.

Bisher gibt es nur drei genomweite Studien, die AS unter Hypoxie untersucht haben. Die Studien haben das AS in Hepatomzellen, mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen untersucht⁹⁰⁻⁹². Außerdem wurde eine weitere Studie in HUVECs mit CoCl₂ als Hypoxie-Mimik durchgeführt⁸⁴. Innerhalb der Studien gibt es nur geringe Überschneidungen. Bei einem Vergleich zwischen der Studie in HUVEC unter Hypoxie⁹² und mesenchymalen Stammzellen⁹¹ wurden nur 3 Gene identifiziert, die sowohl auf Expressions- als auch auf Ebene des AS gleich reguliert sind. Dies spricht für eine sehr spezifische und Zelltyp abhängige Regulation des AS unter Hypoxie.

In der Analyse von Endothelzellen unter Hypoxie wurden neun Gene identifiziert, die alternativ gespleißt werden. Sechs der Gene sind beteiligt an der Angiogenese vermittelten Remodellierung des Zytoskeletts, ein Gen ist beteiligt an der Synthese von Membran-Ankern und zwei Gene sind als universelle Regulatoren an der Genexpression beteiligt⁹². Eins dieser Gene ist der Transkriptionsfaktor MAX (*MYC associated factor X*), der im folgenden Abschnitt 2.5 vorgestellt wird.

2.5 MAX (*MYC associated factor X*)

Merkmale und Charakterisierung

MAX ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor und das zentrale Mitglied in einem Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von Apoptose, Zelldifferenzierung, Proliferation und Transformation beteiligt sind. MAX bildet zum einen Heterodimere mit den MYC Onkoproteinen (c-MYC, L-MYC, N-MYC), wodurch die Zellproliferation aktiviert wird, zum anderen mit verschiedenen MYC Antagonisten (MXD1-4, MNT, MGA), welche zur Differenzierung beitragen und die Proliferation inhibieren (Abb. 2.8)⁹³.

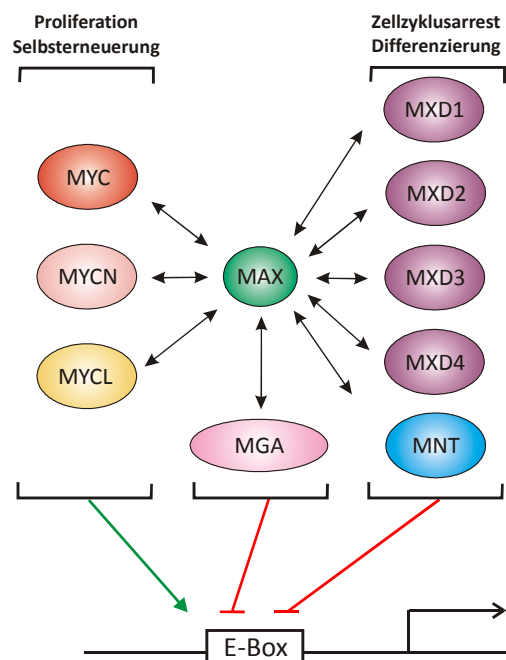


Abbildung 2.8 Schema des MYC/MAX/MXD Netzwerks

Gezeigt sind einige Mitglieder des Transkriptionsfaktor-Netzwerks und ihrer Heterodimerisations-Partner (Interaktion ist gezeigt durch die doppelseitigen Pfeile). Der grüne Pfeil bedeutet Aktivierung der Transkription, die roten Linien bedeuten Repression der Transkription. E-Box = *Enhancer* Box. Abbildung verändert nach⁹³.

Außerdem kann MAX Homodimere bilden, jedoch ist nicht klar, ob die Homodimerisierung *in vivo* stattfindet und die Funktion von MAX beeinflusst⁹⁴. Alle Mitglieder des Netzwerks kodieren eine basische Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper Domäne (bHLH-LZ) für die DNA-Bindung und zur Dimerisierung. Die unterschiedlichen MAX Komplexe konkurrieren um dasselbe DNA Motiv (E-Box) in der Promotorregion zahlreicher Zielgene. MAX/MYC Komplexe aktivieren die Genexpression der Zielgene durch Histon-Modifikationen und erhöhte Transkriptions-Elongation, während MAX/MXD Komplexe die Genexpression reprimieren. Die Expression des Onkogens *MYC* ist in vielen Krebsarten dereguliert⁹³. Auch Mutationen in *MAX* wurden assoziiert mit Phäochromozytom und kleinzelligem Lungenkrebs^{95,96}.

MAX Isoformen

MYC Proteine sind sehr kurzlebig (~15-20 min) und sind auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert⁹⁷. Im Gegensatz dazu ist MAX sehr stabil (> 24 h) und uneingeschränkt exprimiert und es gibt nur wenige Beispiele der posttranskriptionellen Regulation⁹⁸. Zwei miRNAs (miR-22 und miR-193b) regulieren die Expression von MAX herunter und inhibieren dadurch das Fortschreiten des Zellzyklus in normalen und Krebszellen⁹⁹⁻¹⁰¹. Durch alternatives Spleißen von Exon 2 entstehen ein langes (p22) und ein kurzes (p21) Protein, die sich durch eine 9 aa lange Insertion am N-Terminus und ihre Tendenz zur Homodimerisierung unterscheiden (Abb. 2.9)¹⁰². Außerdem wurden zwei weitere mRNA Isoformen identifiziert, die verkürzte C-terminale Varianten kodieren^{103,104}. Diese werden entweder durch ein beibehaltenes Intron (Isoform E) oder durch Inklusion eines Kassettenexons (Isoform C) gebildet (Abb. 2.9). Beide Isoformen (C und E) verstärken die transformierende Wirkung von c-MYC *in vivo*, während der Wildtyp (WT) sie reduziert.

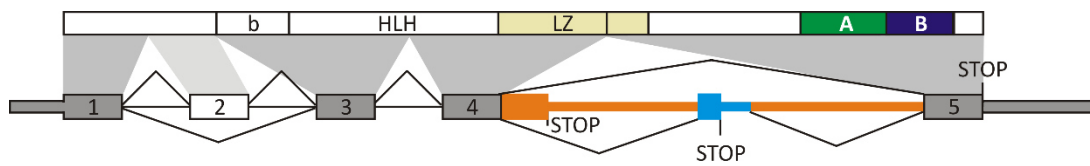


Abbildung 2.9 Übersicht der MAX Isoformen

Im unteren Teil der Abbildung ist die Genstruktur von MAX gezeigt. Konstitutive Exons sind in grau dargestellt, das alternative Exon 2 in weiß. Die Isoformen mit verändertem C-Terminus entstehen durch beibehalten von Intron 4 (orange) für Isoform E oder durch Inklusion des Kassettenexons in Intron 4 (blau) für Isoform C. Introns sind als Striche dargestellt. Im oberen Teil ist die Proteinorganisation gezeigt. b = basische Region, HLH = Helix-Loop-Helix-Motiv, LZ = Leucin-Zipper, A = Region mit sauren aa, B = Region mit basischen aa, auch NLS.

MAX unter Hypoxie

Unter Hypoxie ist die Expression von MYC durch reduzierte Translationseffizienz und Destabilisierung des Proteins verringert¹⁰⁵. Gleichzeitig werden die MAX/MYC Komplexe an den Promotorbindestellen durch die Hochregulierung des Antagonists MXD2 ausgetauscht¹⁰⁶. Eine Änderung von MAX Isoform E wurde unter Hypoxie in Endothelzellen entdeckt⁹² und in dieser Arbeit näher untersucht.

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Hypoxie spielt eine bedeutende Rolle bei vielen pathologischen Prozessen wie vaskulären Erkrankungen oder auch Tumoren. Während die transkriptionelle Anpassung schon intensiv untersucht wurde, wurde der posttranskriptionellen Regulation bisher wenig Beachtung geschenkt. Insbesondere das AS eröffnet eine Möglichkeit der schnellen und sehr spezifischen Anpassung an hypoxische Bedingungen. Deshalb habe ich zwei Gene, die bereits im Zusammenhang mit Hypoxie in Endothelzellen identifiziert wurden, in meiner Arbeit näher untersucht.

In einer genomweiten Studie in Endothelzellen unter Hypoxie wurden neun Gene identifiziert, die ein verändertes Spleißmuster aufweisen. Eines davon ist der MYC assoziierte Faktor X (MAX), ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor in einem Netzwerk, das die Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert. Deshalb sollte untersucht werden, welche Funktion die Induktion der alternativen Isoform E unter Hypoxie erfüllt. Dazu sollten die Isoformen auf mRNA- und Proteinebene charakterisiert und anschließend die Auswirkungen auf die MYC/MAX Zielgene durch geänderte MAX Expression untersucht werden.

Durch neuere Studien wurde gezeigt, dass deregulierte Spleißfaktoren zum Fortschreiten von Tumoren beitragen können. Um die Regulation solcher Proteine besser zu verstehen, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit das AS des RNA bindenden Proteins hnRNP DL charakterisiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass unter Hypoxie eine unproduktive mRNA Isoform induziert wird, die zu einer geringeren Proteinmenge in Endothelzellen führt. Deshalb sollte überprüft werden, welche Auswirkungen auf die Proliferation sich durch reduzierte Mengen von hnRNP DL in HUVEC ergeben. Außerdem sollte untersucht werden, ob auch hnRNP DL das eigene Spleißen in einem negativen *feedback loop* reguliert, wie es bereits für Mitglieder der SR und hnRNP Familien gezeigt wurde. Auch eine Crossregulation mit dem nah verwandten Protein hnRNP D sollte überprüft werden.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte (Kapitel 3.1 und 3.2). Im ersten Teil wird das alternative Spleißen von *MAX* unter Hypoxie beschrieben. Es werden zwei Isoformen analysiert, die unter Hypoxie induziert werden. Außerdem wird gezeigt, dass es sich in beiden Fällen um unproduktive Isoformen handelt, die zu keinem funktionalen Protein führen, sondern vielmehr dazu dienen, die Menge des Wildtyps unter Hypoxie zu regulieren. Im zweiten Teil wird die Regulation des RNA bindenden Proteins hnRNP DL näher untersucht. hnRNP DL wird ebenfalls unter Hypoxie alternativ gespleißt. Außerdem reguliert das Protein das Spleißen der eigenen prä-mRNA in einem negativen *feedback loop* und es erfolgt eine Crossregulation mit dem nah verwandten hnRNP D.

3.1 Alternatives Spleißen von *MAX* unter Hypoxie

3.1.1 Hypoxie induziert den Anstieg zweier *MAX* Isoformen

Das alternative Spleißen in Endothelzellen (HUVEC) wurde unter normalen und sauerstoffarmen Bedingungen (Hypoxie) untersucht. Dazu wurde ein Exon Array durchgeführt und insgesamt neun Gene identifiziert, die ein verändertes Spleißmuster unter Hypoxie aufweisen⁹². *MAX* ist eines dieser Gene und wurde im Folgenden näher untersucht.

Struktur der identifizierten *MAX* Isoformen

Es wurden zwei mRNA Isoformen (C und E) identifiziert, die beide unter Hypoxie induziert werden. Einen Überblick über die Organisation des *MAX* Gens gibt Abbildung 3.1. Die identifizierten Isoformen unterscheiden sich ausschließlich an ihrem 3' Ende von der Wildtyp Sequenz. Der Wildtyp selbst besteht aus 160 aa und wird durch 5 Exons (Exon 1-5) kodiert. Dabei gibt es den Wildtyp in zwei Varianten, mit und ohne Exon 2 (p22 und p21). Das alternative Exon 2 kodiert für 9 aa direkt vor dem basischen Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH, aa 13-21) und ist in der höher exprimierten Form in HUVECs nicht vorhanden. Deshalb wurden alle weiteren Experimente mit der kürzeren Wildtyp Variante ohne Exon 2 durchgeführt. Zum besseren Verständnis wurde die Nummerierung des Volllängenproteins (aa 1-160) beibehalten. Der Wildtyp kodiert für eine basische Helix-Loop-Helix-Struktur (aa 22-74) sowie einen Leucin-Zipper (LZ, aa 75-103). Weiterhin ist am C-Terminus des Wildtyps eine Region saurer aa (A, aa 135-148) gefolgt von einer Region basischer aa (B, aa 149-156) kodiert. Die basische Region dient auch als Kernlokalisationssequenz (NLS).

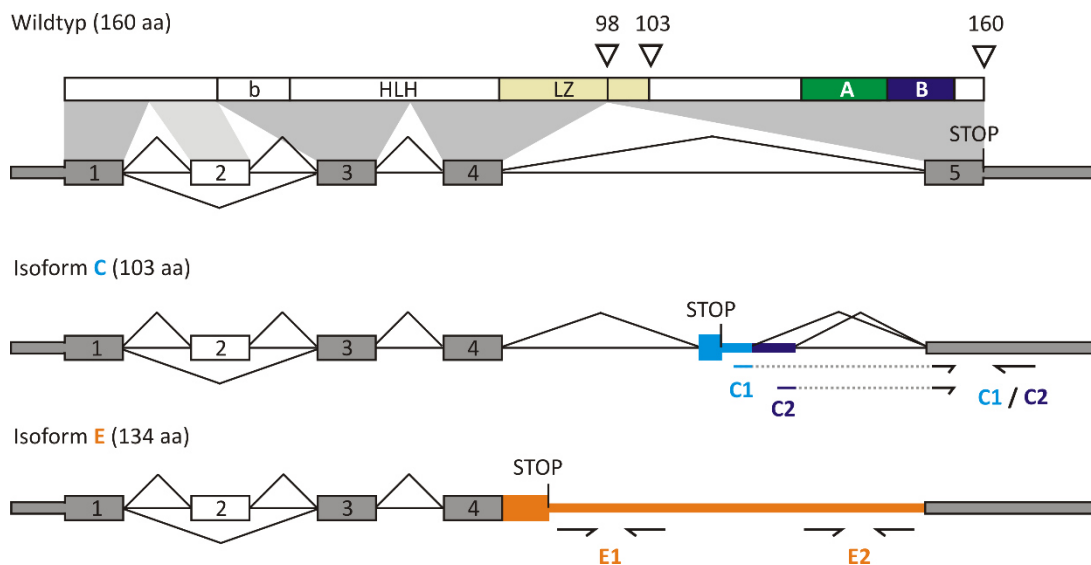


Abbildung 3.1 Übersicht der MAX Isoformen

Übersicht der MAX Isoformen in HUVECs. Isoform C enthält ein Kassettenexon (blau) in Intron 4. Durch die Benutzung von zwei unterschiedlichen 5' Spleißstellen kommt das Exon in zwei Längen vor (hell- bzw. dunkelblau). In Isoform E wird Intron 4 beibehalten (orange). Exons sind als graue/weiße Kästchen dargestellt, Introns als Striche. Die Pfeile zeigen die Lokalisation der Oligonukleotide für RT- und qPCR in Abbildung 3.3 an. b = basische Region, HLH = Helix-Loop-Helix-Motiv, LZ = Leucin-Zipper, A = Region mit sauren aa, B = Region mit basischen aa, auch NLS.

Alle Isoformen teilen die Exons 1-4 und haben damit eine identische aa-Sequenz für die ersten 98 aa. Sie unterscheiden sich ausschließlich am 3' Ende bzw. auf Proteinebene durch einen veränderten C-Terminus vom Wildtyp. Dies wird bei Isoform E durch ein beibehaltenes Intron 4 erreicht, während die mRNA von Isoform C ein Kassettenexon in Intron 4 beibehält. In Isoform E wird durch das beibehaltene Intron eine 36 aa lange Sequenz angefügt. Bei Isoform C werden 5 andere aa angehängt. Durch die veränderten C-Termini wird der Leucin-Zipper verkürzt, da das letzte Leucin (Position 102) nicht mehr enthalten ist. Außerdem sollte den Isoformen C und E eine NLS fehlen, sodass die kodierten Proteine im Zytoplasma verbleiben.

Die Sequenzen der Spleißstellen sind in Abbildung 3.2 gezeigt. Für Isoform C werden zwei verschiedene 5' Spleißstellen verwendet, wodurch das Exon in zwei unterschiedlichen Längen (C1 und C2) vorkommt. Im unteren Teil der Abbildung sind die Isoform spezifischen aa gezeigt.

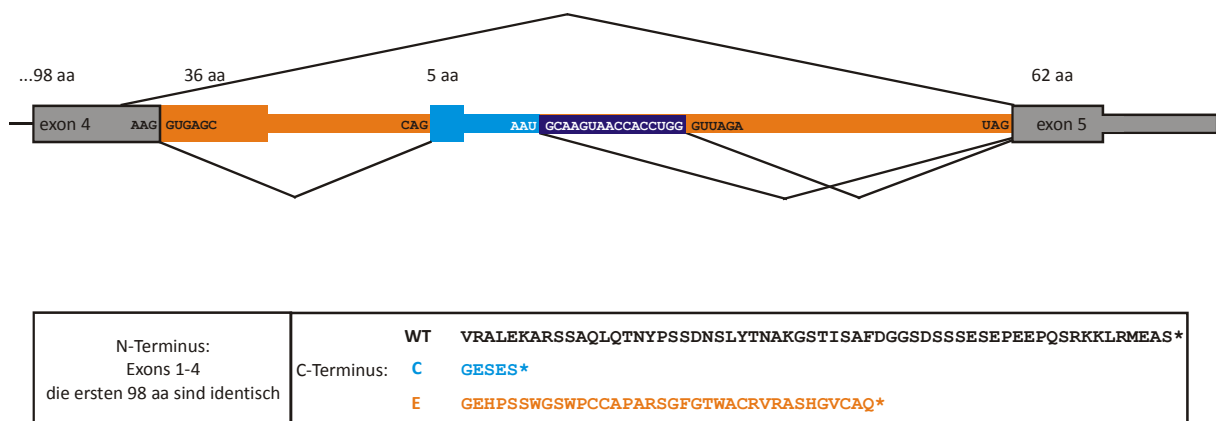


Abbildung 3.2 Übersicht der verschiedenen MAX mRNA Isoformen

Der Wildtyp ist in grau gezeigt, Isoform E in orange. In Blau sind die Isoformen C1 und C2 gezeigt, die ein Kassettenexon mit unterschiedlicher 5' Spleißstelle enthalten. Im unteren Teil der Abbildung sind die aa-Sequenzen der unterschiedlichen C-Termini gezeigt.

Isoform C und E werden durch Hypoxie induziert

HUVECs wurden in 6 cm Schalen ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Induktion zu 100% konfluent waren. Anschließend erfolgte die Inkubation entweder bei Normoxie (21% O₂) oder bei Hypoxie (1% O₂) für jeweils 48 h. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mit Hilfe der MuLV in cDNA umgeschrieben. Die weiteren Analysen erfolgten durch RT-PCR und qPCR.

Die mRNA Isoformen wurden mit Isoform spezifischen Oligonukleotidpaaren quantifiziert und dabei ein 3facher Anstieg für Isoform E und ein 6facher Anstieg für Isoform C unter Hypoxie festgestellt (Abb. 3.3 A). Für jede Isoform wurden spezifische Oligonukleotide verwendet. Diese wurden so gewählt, dass das vorwärts gerichtete Oligonukleotid die Exon-Exon-Grenze überspannt (Wildtyp und Isoform C). Für Isoform E wurden Sequenzen innerhalb des Introns verwendet, die weder im Wildtyp noch in Isoform C vorkommen. Bei diesen Oligonukleotiden kann in der qPCR nicht zwischen amplifizierter gDNA und mRNA bzw. cDNA unterschieden werden. Deshalb wurden parallel Kontrollen mitgeführt, bei denen die RNA als Templat eingesetzt wurde, um somit Verunreinigungen der Proben mit gDNA auszuschließen. Um die Spezifität der einzelnen Oligonukleotidpaare zu gewährleisten, wurden zunächst alle Fragmente in das pJET Plasmid kloniert und dann eine qPCR mit der richtigen und der zu diskriminierenden Isoform durchgeführt. Daraus konnte die Spezifität abgeleitet werden. Das Oligonukleotidpaar für den Wildtyp erkennt die eigene Isoform 700fach besser als Isoform C (C1 und C2). Die Oligonukleotide für Isoform C (C1 und C2) erkennen die eigene Isoform 800fach besser als den Wildtyp und alle Oligonukleotidpaare erkennen die eigene mRNA 80fach besser als Isoform E.

Durch das veränderte Spleißen zugunsten der Isoformen C und E unter Hypoxie, nimmt die mRNA Menge für den Wildtyp ab (Abb. 3.3 B). Die Gesamtmenge der MAX mRNA wurde in dem konstanten Bereich mit Oligonukleotiden in Exon 3 und 4 gemessen und bleibt unter Hypoxie unverändert (Abb. 3.3 B).

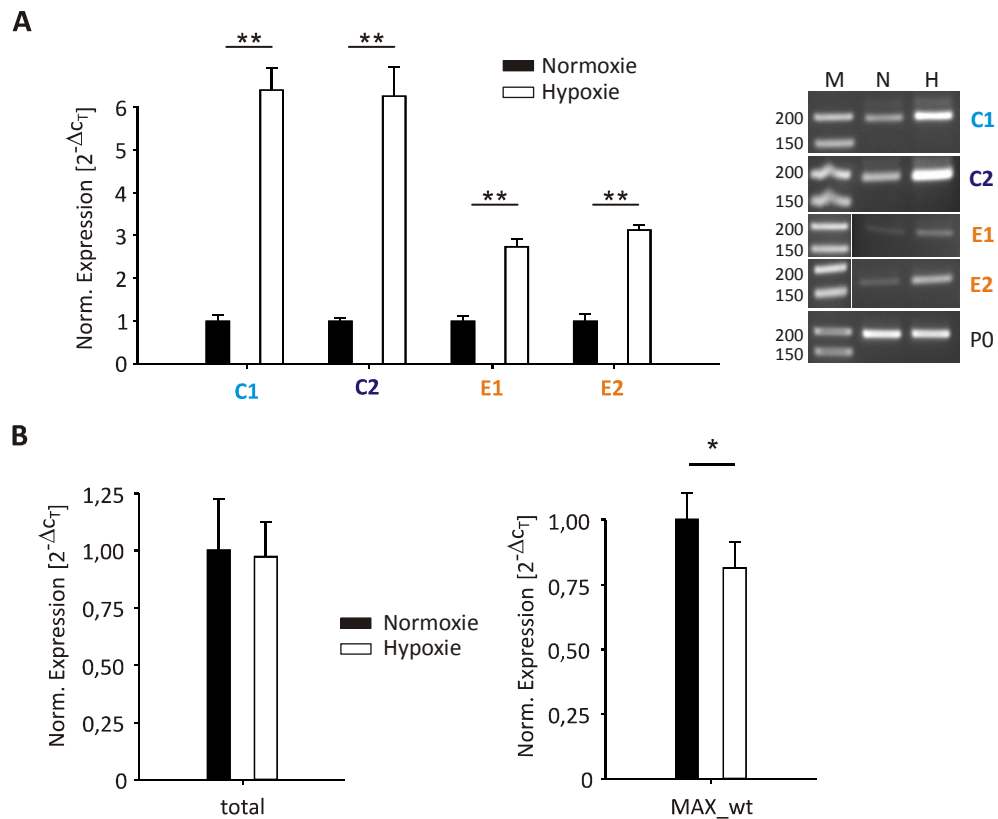


Abbildung 3.3 Induzierte Isoformen von MAX unter Hypoxie

A MAX mRNA Isoformen C und E werden durch Hypoxie induziert. Links: Quantifizierung von Isoform C und E unter Normoxie oder Hypoxie aus HUVEC in einer qPCR. Für Isoform E wurden zwei Oligonukleotidpaare stromauf- und -abwärts des Kassettenexons verwendet, um die vollständige Retention von Intron 4 zu prüfen. Die Werte wurden auf die MAX Gesamt-mRNA-Menge bezogen. n=3, ** p-Wert < 0,01. Rechts: RT-PCR derselben Proben für Isoform C und E. Für Isoform C (C1 und C2) wurden 8 Zyklen mehr als für Isoform E (E1 und E2) in der PCR durchgeführt um die Fragmente visualisieren zu können. Als Referenzgen wurde RPLP0 (P0) verwendet. N = Normoxie, H = Hypoxie, M = Größenstandard in bp. **B** Links: qPCR Quantifizierung der Gesamtmenge der MAX mRNA in HUVEC bei Normoxie und Hypoxie. Oligonukleotide liegen im konstanten Bereich (Exon 3-4). Die Werte wurden auf das Referenzgen RPLP0 normalisiert. n = 5. Rechts: qPCR Quantifizierung des MAX Wildtyps (WT) in HUVEC bei Normoxie und Hypoxie. Das vorwärts gerichtete Oligonukleotid erkennt die Exon-Exon-Grenze der Exons 4-5, die spezifisch für den Wildtyp ist. Die Werte wurden auf die MAX Gesamt-mRNA-Menge normiert. n = 5, * p-Wert < 0,05.

Intron 4 wird komplett beibehalten

Zur genaueren Charakterisierung der identifizierten mRNA Isoformen wurde überprüft, ob Intron 4 komplett beibehalten wird (Isoform E) oder ob es weitere Isoformen gibt, in denen das Intron nur partiell enthalten ist und beispielsweise die Spleißstellen des alternativen Kassettenexons verwendet werden.

Dazu wurde cDNA aus HUVECs verwendet, die für 48 h bei Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert wurden. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass festgestellt werden kann, ob sowohl der Bereich stromaufwärts als auch der Bereich stromabwärts von dem Kassettenexon auf der mRNA vorhanden sind. Zwei Oligonukleotidpaare umschließen entweder den stromaufwärts (P1) oder stromabwärts (P2) liegenden intronischen Bereich

(Abb. 3.4). In der RT-PCR sieht man, dass beide intronischen Bereiche simultan in der mRNA vorkommen (Isoform E, orange markiert), während nur ein sehr geringer Teil ausschließlich stromauf- oder -abwärts Sequenzen enthält (grau markiert). Es ist anzumerken, dass eine Amplifikation von Exon 4 bis Exon 5 aufgrund der zu amplifizierenden Länge nicht möglich war, da Intron 4 über 1200 bp groß ist.

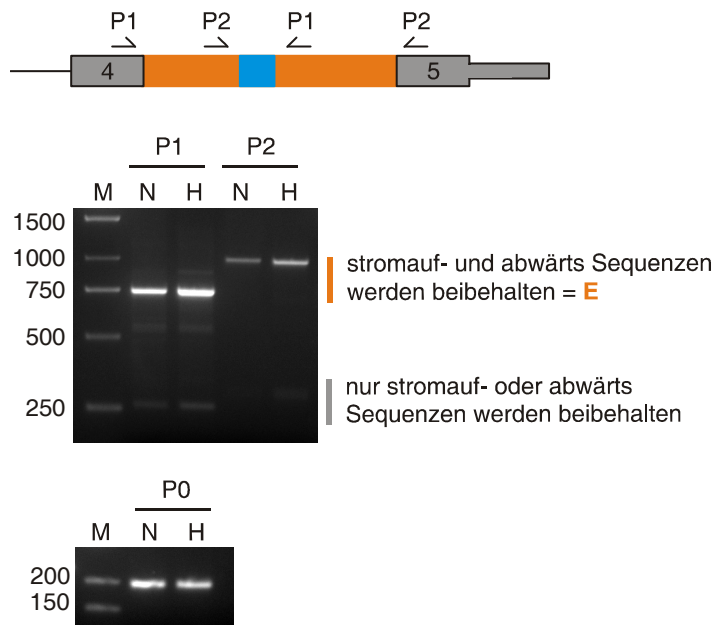


Abbildung 3.4 Intron 4 wird komplett beibehalten

RT-PCR der MAX Isoformen, die Intron 4 beibehalten in HUVECs. Die Oligonukleotidpaare (P1 und P2) sind im oberen Schema als Pfeile gezeigt. Grau ist die Wildtyp-Sequenz, orange das beibehaltene Intron 4, blau das Kassettenexon von Isoform C. Das Referenzgen *RPLP0* (P0) ist als Ladekontrolle gezeigt. N = Normoxie, H = Hypoxie. M = Größenstandard in bp.

3.1.2 MAX Isoform C wird durch den NMD-Mechanismus degradiert

Isoform C zeichnet sich durch ein Kassettenexon am 3' Ende aus, in dem auch der Translationsstop lokalisiert ist. Dadurch enthält Isoform C im Gegensatz zu Isoform E oder dem Wildtyp einen zusätzlichen Exon-Junction-Komplex, der sich hinter dem Stopcodon befindet. Damit ist die mRNA ein potentielles Ziel für den NMD-Mechanismus. Deshalb wurde zur weiteren Untersuchung eine Behandlung mit Cycloheximid als Translationsinhibitor durchgeführt, dieser verhindert die translationsabhängige Degradation von Zielen des NMD. Außerdem wurde eine transiente Herunterregulation des NMD-Faktors UPF1 durchgeführt (Abb. 3.5). Isoform E bleibt sowohl nach der CHX-Behandlung als auch nach dem UPF1 *knockdown* unverändert, während für Isoform C unter beiden Bedingungen ein Anstieg beobachtet werden kann. Somit konnte Isoform C in HUVECs als NMD-Ziel bestätigt werden.

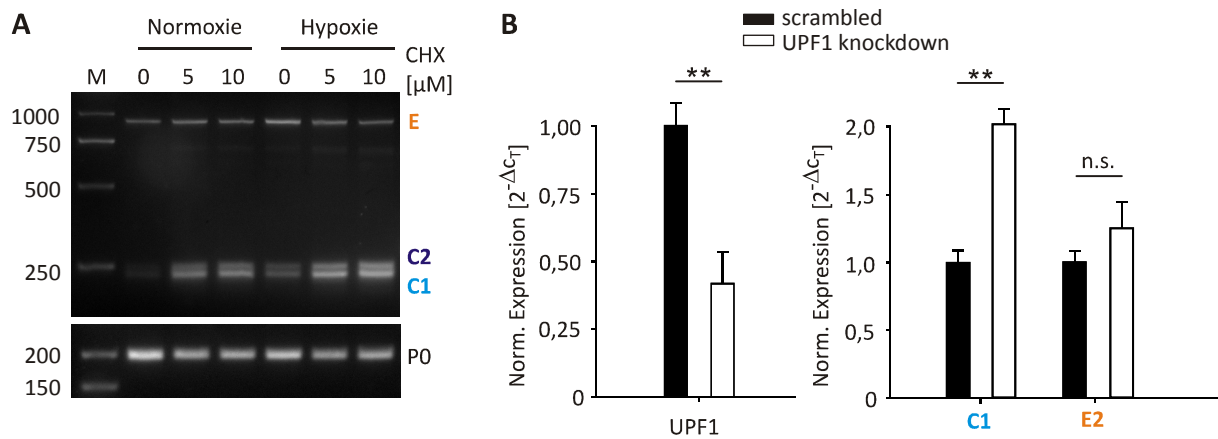


Abbildung 3.5 Isoform C ist Ziel des NMD-Mechanismus

A RT-PCR von Isoform C und E nach CHX-Behandlung in HUVEC. *RPLP0* (P0) wurde als Referenzen mitgeführt. M = Größenstandard in bp. **B** qPCR nach transientem *UPF1 knockdown* in HUVEC quantifiziert die mRNA-Mengen von *UPF1* (links) sowie die Isoformen C und E (rechts). Die Werte wurden auf *RPLP0* normalisiert. n = 3. ** p-Wert < 0,01, n.s. = nicht signifikant.

3.1.3 Isoform E kodiert ein instabiles Protein

Isoform E behält Intron 4 bei und kodiert dadurch für ein Protein mit verändertem C-Terminus (Abb. 3.2). Da die mRNA unter Hypoxie ansteigt, sollte das Protein und dessen Funktion näher charakterisiert werden.

Dazu wurde zum einen die CDS von Wildtyp und Isoform E in ein Plasmid mit N-terminalem FLAG-Tag kloniert, sodass beide Proteine als Fusionsprotein exprimiert werden. Zum anderen wurde ein sogenanntes Full-Konstrukt untersucht, in dem neben der CDS für den konstitutiven Bereich auch Intron 4 vorliegt, sodass durch alternatives Spleißen alle Isoformen entstehen können (Abb. 3.6 A). Die Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und anschließend die Proteinexpression analysiert. Der Wildtyp ist stark exprimiert, während für Isoform E weder im Full-Konstrukt noch für die CDS allein ein Signal detektiert werden konnte (Abb. 3.6 B und C). Die mRNA-Menge des Wildtyps und der Isoform E wurde quantifiziert, um auszuschließen, dass die fehlende Proteinexpression auf einer geringen mRNA-Menge beruht, was ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.4 C). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Full-Konstrukt alle mRNA Spezies exprimiert und somit für den Wildtyp und Isoform E eine Proteinexpression erwartet wurde. Da Isoform C wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben ein Ziel für den NMD darstellt, wird hier keine Proteinexpression erwartet.

Um die Konstrukte zu überprüfen und eine generelle Translatierbarkeit beider Proteine zu bestätigen, wurde eine *in vitro* Translation mit Weizenkeim-Extrakt für FLAG-WT sowie FLAG-E durchgeführt. Für beide Proteine wurde ein starkes Signal detektiert (Abb. 3.6 D).

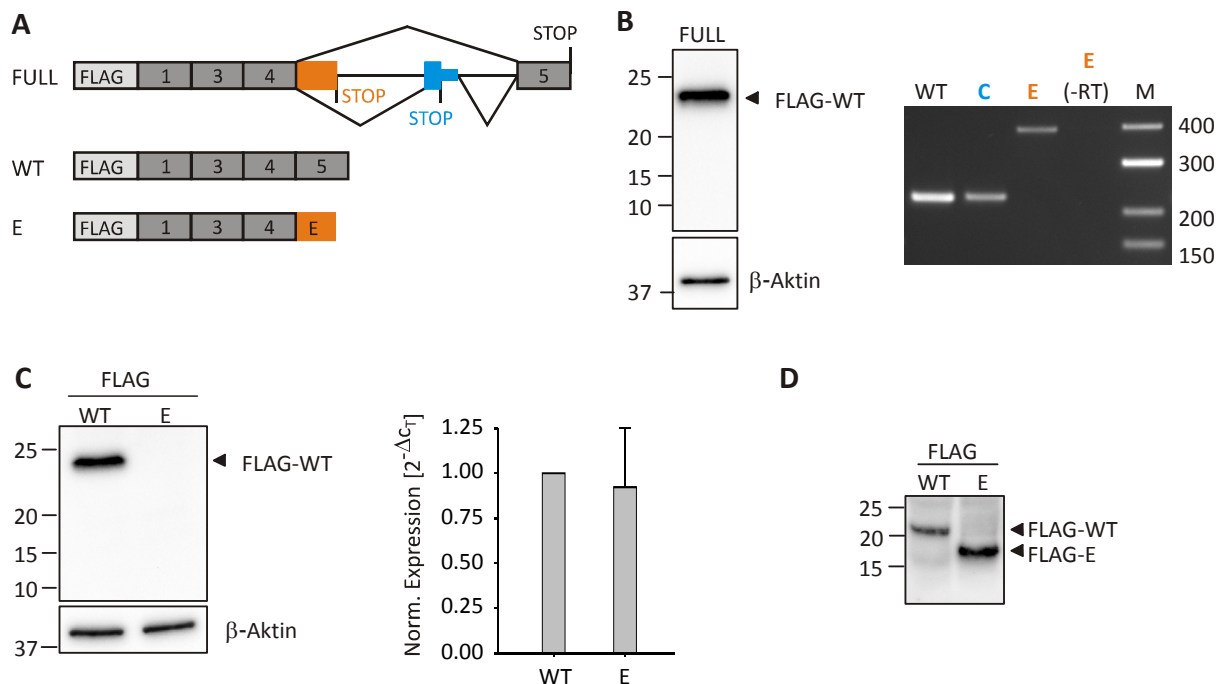


Abbildung 3.6 Isoform E kodiert ein instabiles Protein

A Schema der FLAG-Konstrukte mit N-terminalem FLAG-Tag. FULL = MAX CDS mit Intron 4, kodiert für alle Isoformen. WT = Wildtyp CDS, E = Isoform E CDS. **B** Das Full-Konstrukt exprimiert alle mRNA Isoformen, aber nur das Wildtyp Protein. Links: Western Blot des Full-Konstrukts in HeLa-Zellen. Anti-FLAG Antikörper wurde verwendet, um die Fusionsproteine zu detektieren, Anti-β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Größenangabe in kDa. Rechts: RT-PCR der mRNAs aus dem Full-Konstrukt mit FLAG spezifischen Oligonukleotiden. Für Isoform C (C) wurden 5 zusätzliche Amplifikationsrunden durchgeführt. Für Isoform E (E) wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA (-RT) durchgeführt. M = Größenstandard in bp. **C** FLAG-WT und -E Expression. Links: Western Blot der FLAG-MAX Fusionen in HeLa-Zellen. Anti-FLAG Antikörper wurde verwendet zur Detektion der Fusionsproteine, Anti-β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Größenangabe in kDa. Rechts: qPCR Quantifizierung der FLAG spezifischen WT- und E-mRNAs. Die Werte wurden auf das Referenzgen *RPLP0* normalisiert. **D** In vitro Translation von FLAG-WT und -E. Detektion im Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper. Größenangabe in kDa.

Um auszuschließen, dass die *in vivo* Expression durch den FLAG-Tag negativ beeinflusst wird, wurde anstelle des FLAG-Tags ein 3facher HA-Tag verwendet. Dazu wurde die CDS des HA-Tags N-terminal an die CDS des Wildtyps (HA-WT) und Isoform E (HA-E) angefügt, sodass ein Fusionsprotein entsteht. Nach Überexpression in HeLa-Zellen konnte weiterhin nur der Wildtyp detektiert werden (Abb. 3.7 A).

Um die Präparations-Methode zu überprüfen wurde die 5fache Menge Proteinase-Inhibitor-Cocktail bei der Proteinpräparation eingesetzt, ganze Zellen in Protein-Auftrags-Puffer lysiert bzw. das Sediment, welches bei der Protein-Lyse entsteht, untersucht (Abb. 3.7 B und C). Weiterhin wurden die FLAG-Isoformen mit Exon 2 auf ihre Expression in HeLa-Zellen überprüft (Abb. 3.7 D). Da die mRNA von Isoform E in HUVECs unter Hypoxie identifiziert wurde und hier ansteigt, wurde überprüft, ob unter genannten Bedingungen eine Expression von FLAG-E vorliegt (Abb. 3.7 E). Jedoch konnte unter keiner der genannten Bedingungen ein Protein für FLAG-E nachgewiesen werden.

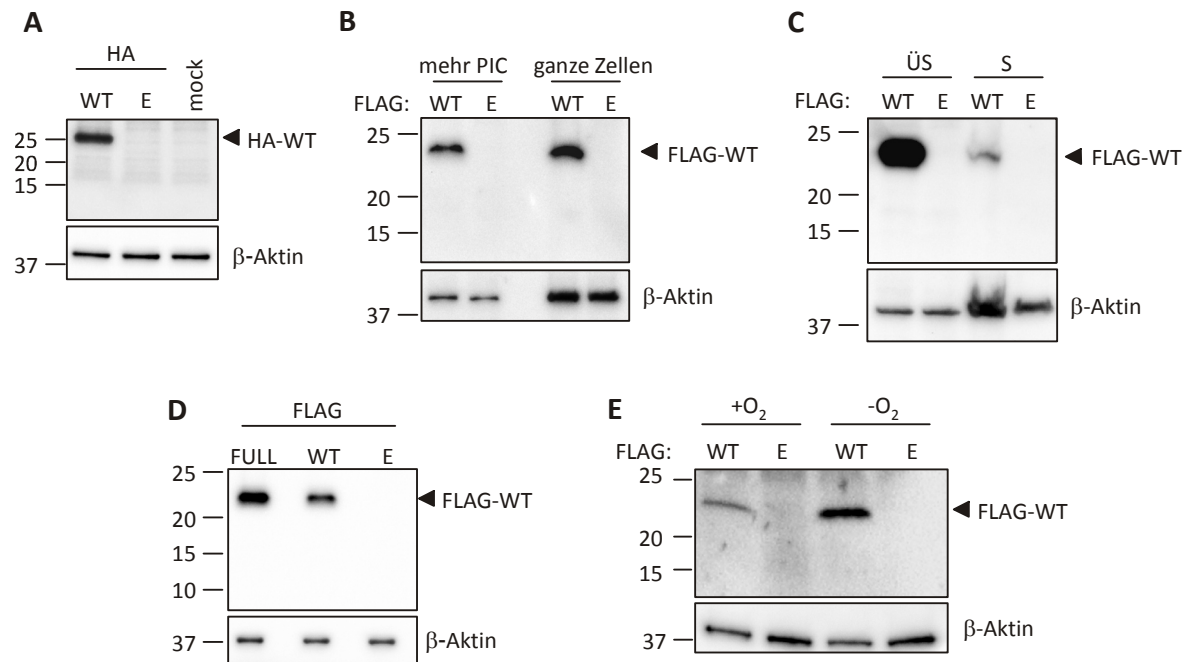


Abbildung 3.7 MAX Isoform E ist nicht detektierbar

A MAX Isoformen mit N-terminalem, 3fachem HA-Tag wurden in HeLa-Zellen überexprimiert. Western Blot mit Anti-HA Antikörper und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. **B** Überexpression von FLAG-WT und -E in HeLa-Zellen, Proteinpräparation mit der 5fachen Menge PIC (mehr PIC) oder Lyse von ganzen Zellen in Protein-Auftragspuffer (ganze Zellen). Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. **C** Überexpression von FLAG-WT und -E in HeLa-Zellen, bei der Protein-Lyse wurde der Protein-Extrakt (Überstand, ÜS) und die Zelltrümmer (Sediment, S) in Protein-Auftragspuffer aufgetragen. Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. **D** FLAG-FULL/-WT und -E mit der CDS von MAX p22 (enthält Exon 2) wurden in HeLa-Zellen überexprimiert. Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. **E** HUVECs wurden mit FLAG-WT/E transfiziert und für 48 h bei Normoxie (+O₂) oder 48 h bei 1% Hypoxie (-O₂) inkubiert. Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa.

Um Isoform E detektieren zu können, wurde die CDS an GFP fusioniert, welches eine stabilisierende Wirkung auf andere Proteine ausüben kann¹⁰⁷. Dabei wurde GFP N-terminal exprimiert und die CDS vom Wildtyp (GFP-WT) oder Isoform E (GFP-E) C-terminal angefügt. Die Expression beider Proteine erfolgte dabei getrennt durch eine kurze Serin-Glycin-Linker-Sequenz (SGGG), sodass beide Proteine ihre normale Konformation einnehmen können. Sowohl GFP-WT als auch GFP-E werden in HeLa-Zellen exprimiert, die detektierte Proteinmenge für GFP-E ist dabei deutlich geringer als die Menge von GFP und GFP-WT. Außerdem konnte ein spezifisches Abbauprodukt von GFP-E beobachtet werden (Abb 3.8 A).

Auch mit diesen Konstrukten wurde getestet, ob eine Stabilisierung in HUVECs unter Hypoxie stattfindet, also die Bedingung unter der die mRNA-Menge von Isoform E ansteigt. Dieser Anstieg kann jedoch auf Proteinebene nicht beobachtet werden (Abb. 3.8 B), was die Ergebnisse der FLAG-E Expression unter Hypoxie bestätigt. Auch hier ist die Expression von GFP-E deutlich geringer als die Expression des GFP-WT.

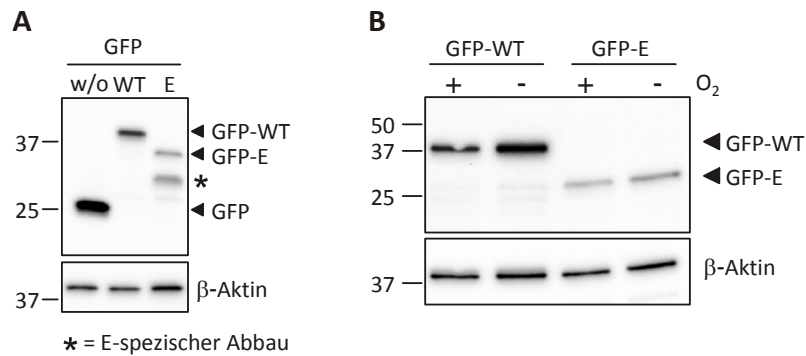


Abbildung 3.8 GFP-E ist schwach exprimiert in HeLa-Zellen und HUVEC

A Western Blot der GFP-MAX-Fusionen. Die CDS des MAX Wildtyp (GFP-WT) und Isoform E (GFP-E) wurden C-terminal an GFP fusioniert und in HeLa-Zellen überexprimiert. Anti-GFP Antikörper wurde zur Detektion der Fusionsproteine verwendet, Anti- β -Aktin als Ladekontrolle. **B** HUVECs wurden mit GFP-WT/E transfiziert und für 48 h bei Normoxie (+ O_2) oder 48 h bei 1% Sauerstoff (- O_2) inkubiert. Western Blot mit Anti-GFP Antikörper oder Anti- β -Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa.

3.1.4 Lokalisierung von Wildtyp und Isoform E

Isoform E konnte bei Überexpression als FLAG-E oder HA-E nicht detektiert werden, als Fusionsprotein mit GFP hingegen wird das Protein schwach exprimiert. Im Gegensatz zum Wildtyp weist Isoform E keine vorhergesagte NLS auf, deshalb wird zunächst die Lokalisation der MAX-GFP-Fusionen untersucht. Der Wildtyp kommt wie erwartet ausschließlich im Nukleus vor, während Isoform E auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3.9 A).

Da Protein E translatiert werden kann (siehe *in vitro* Translation, Abb. 3.6 E), könnte die fehlende Expression auf einen möglichen Abbauweg des Proteins im Zytoplasma hinweisen. Daher wurde getestet, ob durch Anfügen einer NLS eine Stabilisierung von Isoform E erreicht werden kann. Dazu wurde die SV40 NLS verwendet, die zunächst an GFP fusioniert wurde (GFP-NLS), um die Funktionalität zu überprüfen (Abb. 3.9 B). Anschließend wurde zum einen die SV40 NLS an FLAG-E fusioniert und untersucht, ob die Isoform exprimiert wird. Zum anderen wurde ein simultanes Konstrukt des Wildtyps als Kontrolle verwendet. Dazu wurde an die CDS des Wildtyps ohne natürliche NLS (nur aa 1-148) ebenfalls die SV40 NLS fusioniert (148-NLS). In beiden Konstrukten wird die Proteinmenge durch Anfügen der NLS erhöht, für FLAG-E-NLS kann nach langer Belichtung eine schwache Bande beobachtet werden (Abb. 3.9 C).

Die Mengen der Proteine werden zwar durch die NLS erhöht, jedoch kann das Fehlen von Isoform E nicht allein durch eine Lokalisation im Zytoplasma erklärt werden, da die Proteinmenge sehr gering ist.

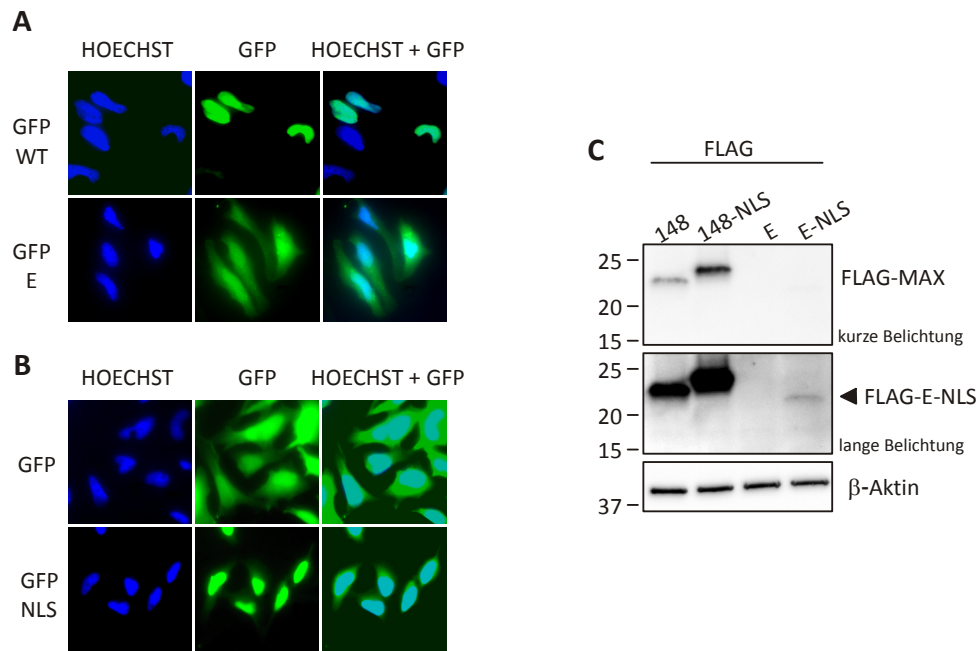


Abbildung 3.9 Lokalisierung der MAX Isoformen

A GFP-MAX-Fusionen wurden in HeLa-Zellen transfiziert und die Nuklei mit Hoechst anfärbt. Die Lokalisation wurde mit den angegebenen Kanälen visualisiert. GFP-WT = Wildtyp; GFP-E = Isoform E, beide C-terminal an GFP fusioniert. **B** Lokalisation von GFP und GFP-NLS in HeLa-Zellen, die Nuklei wurden mit Hoechst anfärbt. Die Lokalisation wurde mit den angegebenen Kanälen visualisiert. **C** Western Blot von FLAG-Konstrukten mit NLS. Folgende Konstrukte wurden in HeLa-Zellen überexprimiert: 148 = Wildtyp ohne NLS, 148-NLS = Wildtyp mit SV40 NLS, E = Isoform E, E-NLS = Isoform E mit SV40 NLS, alle Proteine haben einen N-terminalen FLAG-Tag. Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Derselbe Blot wird in zwei unterschiedlichen Belichtungen gezeigt (kurz/lang). Größenangabe in kDa.

3.1.5 Stabilisierungs- und Destabilisierungsdomänen in Wildtyp und Isoform E

Da durch die bisherigen Ergebnisse nicht geklärt werden konnte, warum Isoform E nicht exprimiert wird, wurden nun die Isoform spezifischen Bereiche näher untersucht. Der Wildtyp und Isoform E teilen die ersten 98 aa, danach folgen im Wildtyp weitere 5 aa, die den Leucin-Zipper vervollständigen (bis aa 103). Am C-Terminus gibt es einen Bereich saurer aa (A, aa 134-148), gefolgt von einem Bereich basischer aa (B, aa 148-160), der auch als NLS dient (Abb. 3.10 rechts).

Um die Funktion dieser einzelnen Domänen näher untersuchen zu können, wurde der FLAG-WT sukzessive verkürzt. Der Name des Konstrukts gibt dabei die letzte noch vorhandene aa an (FLAG-WT 98/103/134/148). Diese Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und anschließend die Expression der Proteine im Western Blot analysiert. Während die Konstrukte WT 98 und WT 103 gar nicht detektiert werden können, zeigen die längeren Varianten WT 134 und WT 148 eine sehr schwache Expression verglichen mit dem nicht verkürzten Wildtyp (Abb. 3.10).

Dies zeigt, dass innerhalb der Wildtyp spezifischen Sequenzen (aa 103-134 und aa 148-160) eine Stabilisierung des Proteins erfolgt, ohne die keine Expression nachzuweisen ist.

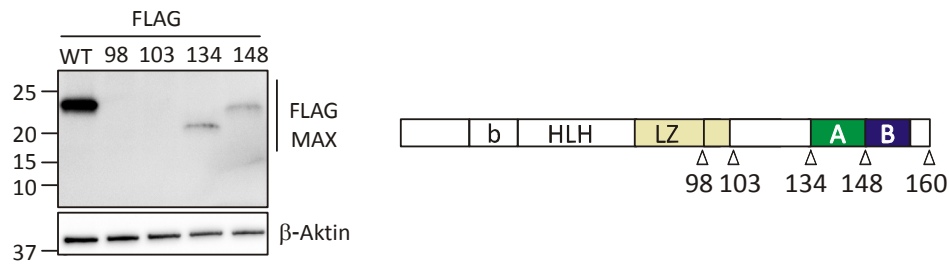


Abbildung 3.10 Wildtyp spezifische Domänen stabilisieren FLAG-MAX-Konstrukte

FLAG-MAX Wildtyp wurde C-terminal verkürzt, die Konstrukte sind benannt nach der letzten vorhandenen aa. Alle Konstrukte exprimieren einen N-terminalen FLAG-Tag. Das Schema der Konstrukte ist rechts gezeigt. b = basische Region, HLH = Helix-Loop-Helix, LZ = Leucin-Zipper, A = Region saurer aa, B = Region basischer aa (NLS). Links ist ein Western Blot nach Überexpression in HeLa-Zellen gezeigt mit Anti-FLAG Antikörper oder Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa.

Die Verkürzungen im FLAG-WT Konstrukt deuten auf stabilisierende Eigenschaften bestimmter Wildtyp-Domänen hin (Abb. 3.10). Um dies isoliert zu betrachten, wurden die Wildtyp-Domänen der sauren (A) und der basischen (B) Region sowie die Isoform E spezifische Region (E99-134) an heterologe Proteine fusioniert. Als Reporter wurde zum einen GFP/P gewählt. Dabei handelt es sich um eine destabilisierte Variante des eGFP-Gens mit sogenannter PEST-Sequenz aus der Maus Ornithin Decarboxylase. Hier wurde die Proteinexpression im Western Blot überprüft. Zum anderen wurden die Domänen an die Firefly-Luziferase fusioniert, sodass die Aktivität quantifiziert werden konnte. Die ausgewählten Sequenzen wurden jeweils C-terminal angefügt, sodass sie ihre natürliche Lokalisation beibehalten. Die Konstrukte wurden benannt nach den aa, die angehängt wurden, also WT 135-148 für die saure Region, WT 149-160 für die basische Region und E 99-134 für die Isoform E spezifische Region (Abb. 3.11 A).

Für die GFP-Konstrukte sieht man, dass durch Anfügen der Isoform E spezifischen Sequenz nur noch eine sehr schwache Expression stattfindet, die erst bei längerer Belichtung zu sehen ist (Abb. 3.11 B). Dies bestätigt die bisherigen Ergebnisse des FLAG-E-Konstrukts, bei dem keine Expression nachzuweisen war. Für die Wildtyp-Domänen wird eine erhöhte Expression bei Anfügen der sauren Region (WT 135-148) sowie der sauren mit der basischen Region (aa 134-160) beobachtet. Die basische Region allein (WT 149-160) zeigt keinen Einfluss auf die GFP-Expression (Abb. 3.11 B). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der FLAG-WT Konstrukte, da hier durch Abwesenheit der basischen Region die Proteinexpression drastisch gesenkt wurde.

Die identischen Bereiche wurden außerdem an die Firefly-Luziferase fusioniert. Dadurch konnten die Effekte quantifiziert werden und durch Normalisierung auf die Renilla-Luziferase konnten Schwankungen der Transfektion ausgeglichen werden. Die Luziferase-Aktivität spiegelt sehr genau das Bild der GFP-Expression wider (Abb. 3.11 C): Eine ca. 2fach erhöhte Expression durch die saure Region (WT 135-148) und ein ca. 1,5facher Anstieg bei Anfügen von saurer und basischer Region (WT 135-160). Die Luziferase-E-Fusion zeigt eine 33fache Reduktion der Luziferase-Aktivität. Als Vergleich wurde die Expression der durch die PEST-Sequenz destabilisierten Luziferase (luc2/P) gemessen, die nur eine 7fache Reduktion im Vergleich zu der Firefly-Luziferase bewirkt.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte auf Unterschiede der Proteinexpression zurückzuführen sind, wurde parallel die mRNA-Menge bestimmt (Abb. 3.11 C rechts). Hier wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Somit kann man sagen, dass die MAX-Domänen eine stabilisierende (WT 135-148) bzw. eine stark destabilisierende (E 99-134) Wirkung auf die Expression heterologer Proteine ausüben.

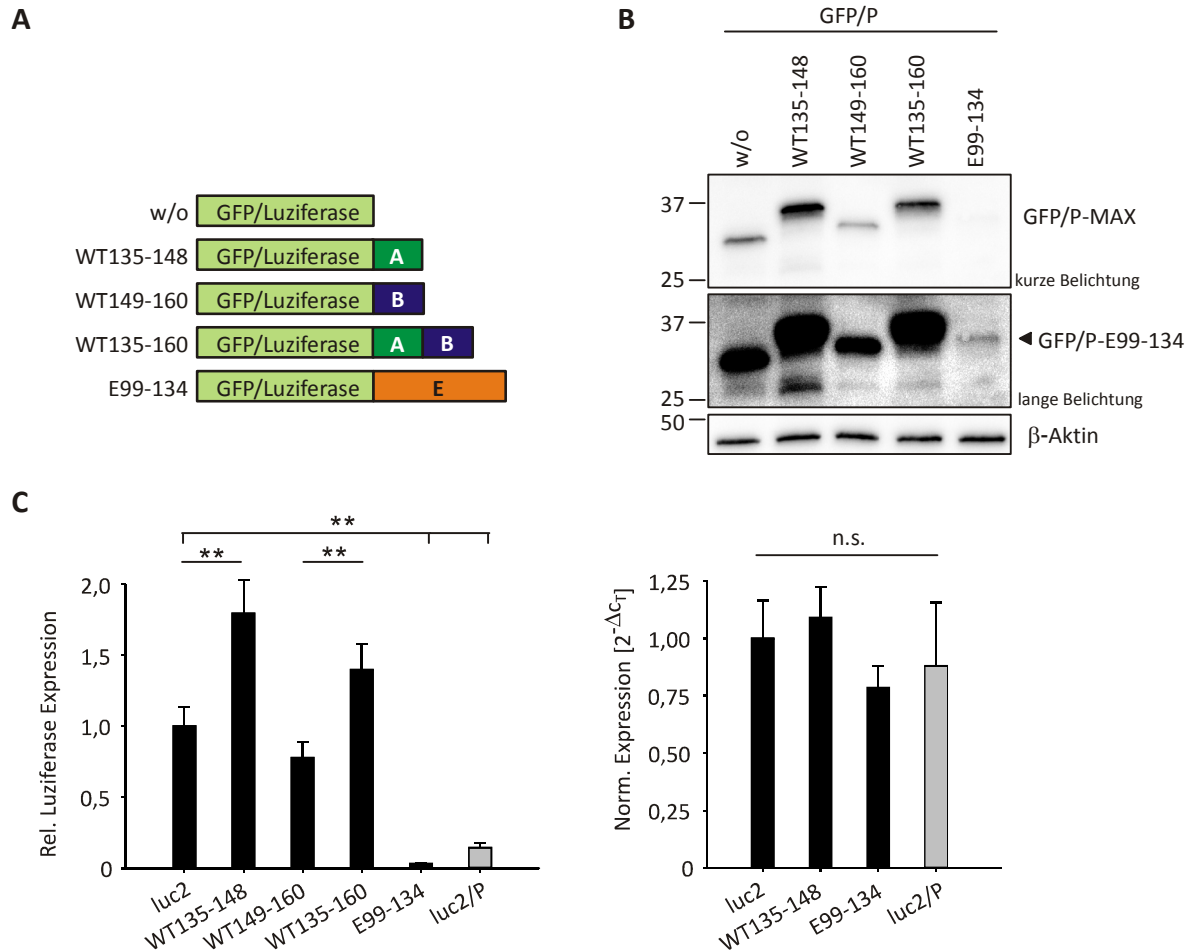


Abbildung 3.11 MAX C-Termini beeinflussen die Expression heterologer Proteine

A Übersicht der GFP- und Luziferase-Konstrukte. Verschiedene Regionen des MAX Wildtyp (WT) und Isoform E (E) wurden C-terminal an GFP/P oder das *luc2* Gen fusioniert. Die Nummern geben die aa der Wildtyp oder E Sequenz an, eine Übersicht der Wildtyp Organisation zeigt Abbildung 3.10. **B** Western Blot von GFP/P mit fusionierten MAX C-Termini. Die Nummern geben die aa von Wildtyp (WT) und Isoform E (E) an, die C-terminal an GFP/P angefügt wurden. Die Konstrukte wurden in HeLa-Zellen überexprimiert, Anti-GFP Antikörper wurde zum Nachweis verwendet und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Derselbe Blot wird nach kurzer und langer Belichtung gezeigt. Größenangabe in kDa. **C** Quantifizierung der Protein-(De)Stabilisierung durch Luziferase-Assays. Links: die angegebenen MAX WT und Isoform E (E) aa-Sequenzen wurden C-terminal an das Gen der Firefly-Luziferase (*luc2*) angefügt und deren Einfluss auf die Expression in HeLa-Zellen gemessen. Die Aktivität wurde auf die Renilla-Luziferase als Transfektionskontrolle normalisiert. Die Nummern geben die angehängten aa von Wildtyp (WT) und Isoform E (E) an (*luc2*, schwarze Balken). *Luc2/P* = Firefly-Luziferase mit PEST Destabilisierungssequenz der Ornithin-Decarboxylase (grauer Balken). $n = 3-8$, ** p -Wert $< 0,01$. Rechts: qRT-PCR Quantifizierung der mRNA -Menge von der Firefly-Luziferase mit den angegebenen C-terminalen Fusionen. Die Werte wurden auf die mRNA-Menge der Renilla-Luziferase als Transfektionskontrolle normalisiert. $n = 3$, n.s. = nicht signifikant.

Die Messung der Luziferase-Aktivität hat gezeigt, dass die Isoform E spezifische Domäne die Expression der Luziferase stark verringert. Nun wurde überprüft, ob es sich dabei um einen Einfluss auf die Proteininstabilität und damit eine Reduktion der Halbwertszeit handelt.

Dazu wurden drei Konstrukte getestet: GFP/P alleine als Referenzwert, GFP/P fusioniert mit der Isoform E spezifischen Region (E 99-134) und als weitere Kontrolle GFP/P mit der Region saurer aa des Wildtyps (WT 135-148), welche bereits eine stabilisierende Wirkung gezeigt haben. HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und anschließend mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Dadurch wird die Produktion neuer Proteine verhindert, sodass die Abbaugeschwindigkeit der Proteine bestimmt werden kann. Um diese zu verfolgen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CHX-Zugabe die Proteine isoliert und die Proteinmenge in einem Western Blot überprüft. Für GFP/P liegt die so bestimmte Halbwertszeit bei ca. 11 h, was dem Literaturwert für die destabilisierte Variante entspricht¹⁰⁸. Im Vergleich dazu sieht man für die Isoform E spezifische Region eine reduzierte Halbwertszeit von ca. 3 h. Die Kontrolle mit der Wildtyp-Sequenz zeigt nach 24 h noch keine Degradation des Fusionsproteins (Abb. 3.12). Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Isoform E spezifische Region eine große Kapazität zur Destabilisierung besitzt, indem sie die Halbwertszeit verringert, während die saure Region des Wildtyp eine entgegengesetzte, stabilisierende Wirkung zeigt.

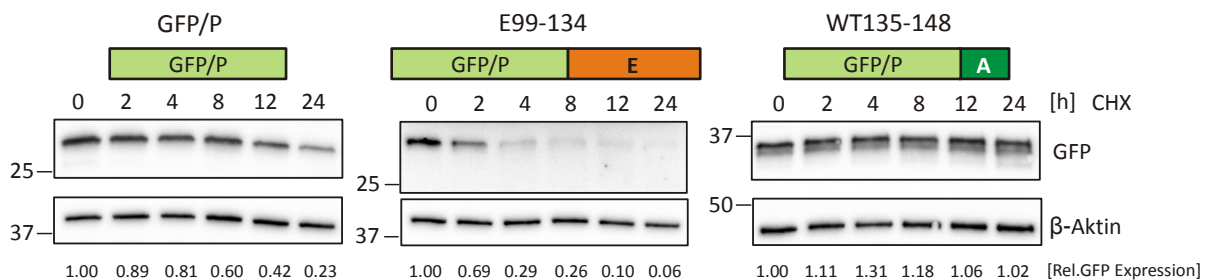


Abbildung 3.12 Die Isoform E spezifische Domäne verringert die Halbwertszeit heterologer Proteine

Die Halbwertszeit von GFP/P mit den C-terminal angefügten aa-Sequenzen von Wildtyp (WT) und Isoform E (E) wurden in HeLa-Zellen bestimmt. Für E wurden alle Isoform E spezifischen aa an GFP/P fusioniert (E 99-134), für den Wildtyp wurde nur die Region saurer aa an GFP/P fusioniert (WT 135-148). Die Zellen wurden mit 10 µg/ml CHX behandelt und die Proteine nach den angegebenen Zeitpunkten präpariert. Western Blot mit Anti-GFP Antikörper zur Detektion der GFP-MAX-Fusionen und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Die angegebenen Werte zur Proteinexpression sind Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten, jeweils auf β-Aktin normiert. Größenangabe in kDa.

3.1.6 Destabilisierungsdomäne in Isoform E

Es wurde gezeigt, dass die Isoform E spezifische Domäne einen negativen Einfluss auf die Protein-Halbwertszeit ausübt (Kapitel 3.1.5). Um diese Funktion näher eingrenzen zu können, wurden in dem Luziferase-Konstrukt mit C-terminal angefügter E spezifischer Sequenz (E 99-134) Mutationen und Verkürzungen vorgenommen.

Zunächst wurde ein phylogenetischer Vergleich der E spezifischen Domäne mit anderen Spezies vorgenommen (Abb. 3.13 A). Dazu wurde ein *Alignment* mit CLUSTALW2 durchgeführt¹⁰⁹. Dabei fällt auf, dass die ersten 19 aa (aa 99-117) deutlich besser konserviert sind als die hinteren 17 (aa 118-134). Deshalb wurde zunächst eine

Verkürzung des angefügten Bereiches von 36 auf 19 aa vorgenommen (E 99-117). Außerdem wurden in einer Region starker Konservierung (aa 105-112) vier aa durch Alanin ausgetauscht (W105A, G106A, P109A, C110A), dieses Konstrukt wurde E 99-134_mut benannt. Schließlich wurden beide Modifikationen in einem Konstrukt vereint, E99-117_mut.

Die Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und anschließend die Luziferase-Aktivität bestimmt. Zur Normalisierung wurden alle Firefly-Werte auf die Werte der Renilla-Luziferase normiert (Abb. 3.13 B). Sowohl das Einbringen der Mutation als auch die Verkürzung sind in der Lage, die Reduktion der Luziferase partiell wieder aufzuheben, die Verkürzung zeigt dabei den größeren Effekt. Durch die Kombination beider Veränderungen wird ein additiver Effekt beobachtet. Dieser erhöht die Luziferase-Aktivität um das ca. 11fache, jedoch ist die Aktivität im Vergleich zu der unmodifizierten Luziferase noch immer 3fach niedriger.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass außer den getesteten Modifikationen noch weitere aa an der Regulation der Proteinstabilität beteiligt sind.

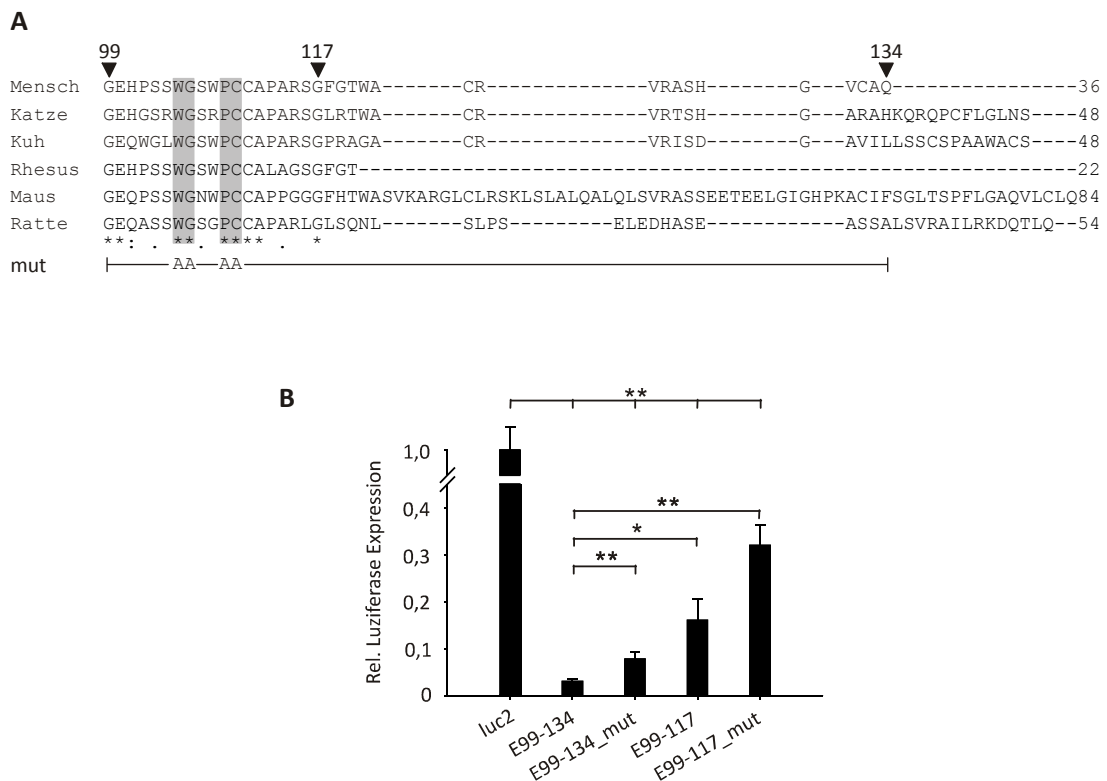


Abbildung 3.13 Analyse der Destabilisierungsdomäne von Isoform E

A Konservierung der Isoform E spezifischen aa. Homologe Sequenzen verschiedener Arten wurden mit ClustalW2 analysiert. Die Nummern geben die aa in der humanen Sequenz an. Die grauen Balken zeigen die aa an, die zu Alanin mutiert wurden. * = konservierte aa, : = Konservierung innerhalb von aa-Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften, . = Konservierung von aa-Gruppen mit weniger ähnlichen Eigenschaften. **B** Quantifizierung der Isoform E abhängigen Destabilisierung durch Luziferase-Assays. Die Isoform E spezifische Domäne (E 99-134) sowie die in Abbildung 3.13 A angegebene Verkürzung (E 99-117) und Mutation (E 99-134mut) wurden C-terminal an die Firefly-Luziferase fusioniert und der Einfluss auf die Aktivität in HeLa-Zellen bestimmt. Die Aktivität wurde auf die Renilla-Luziferase als Transfektionskontrolle normiert. Die Nummern geben die aa der Isoform E (E) an, die an die Firefly-Luziferase (*luc2*) fusioniert wurden. n = 3-8, * p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01.

3.1.7 Abbaumechanismus von Isoform E

Bei Isoform E handelt es sich um ein sehr instabiles Protein, welches bei Überexpression in HeLa-Zellen nicht nachgewiesen werden kann. Die Isoform E spezifischen aa sind in der Lage auch heterologe Proteine zu destabilisieren und deren Halbwertszeit zu reduzieren (Kapitel 3.1.6). Wie Isoform E abgebaut wird, ist jedoch unbekannt.

Da viele Proteine im Proteasom abgebaut werden, wurde dies auch für Isoform E getestet. HeLa-Zellen wurden dazu mit FLAG-WT und FLAG-E transfiziert und anschließend mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Dabei wurden verschiedene Zeitpunkte getestet, jedoch konnte weiterhin kein FLAG-E Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.14 A). Deshalb wurden als Nächstes verschiedene Protease-Inhibitoren sowie Chloroquine als Inhibitor von lysosomalen Enzymen getestet. Die Behandlung erfolgte in gleicher Weise und in den angegebenen Konzentrationen. Auch hier konnte bei keiner Behandlung ein Protein für Isoform E nachgewiesen werden (Abb. 3.14 B).

Der Mechanismus, durch den Isoform E abgebaut wird, bleibt also weiterhin unklar und muss durch weitere Experimente untersucht werden.

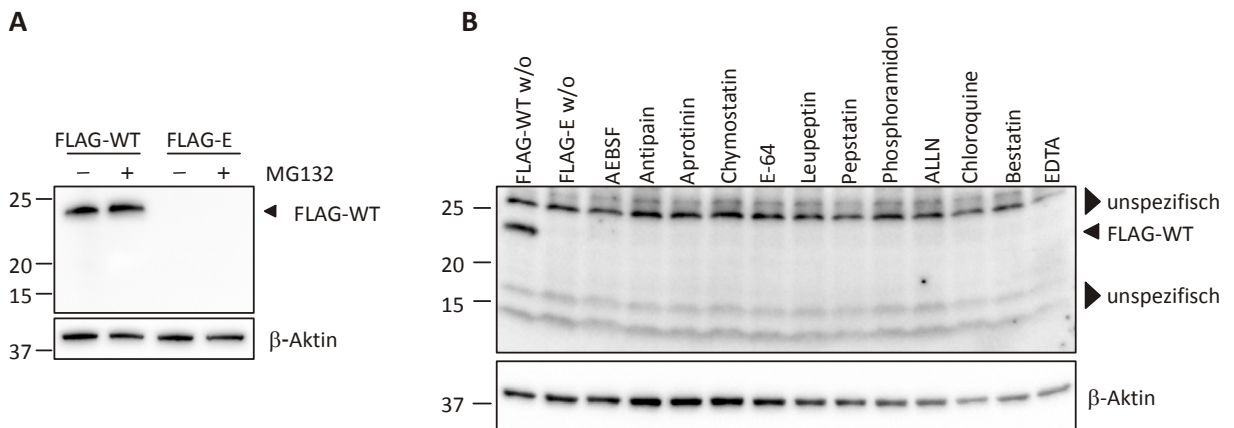


Abbildung 3.14 Abbaumechanismus von Isoform E

A Behandlung mit Proteasom-Inhibitor. HeLa-Zellen wurden mit FLAG-WT oder FLAG-E transfiziert und anschließend für 24 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (10 μ M) behandelt. FLAG-MAX Konstrukte wurden im Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper nachgewiesen und Anti-β-Aktin diente als Ladekontrolle. **B** Behandlung mit Protease-Inhibitoren. HeLa-Zellen wurden mit FLAG-WT oder FLAG-E transfiziert und anschließend für 24 h mit den folgenden Inhibitoren behandelt: 300 μ M AEBF, 50 μ M Antipain, 2 μ g/ml Aprotinin, 100 μ M Chymostatin, 10 μ M E-64, 100 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin, 10 μ M Phosphoramidon, 2 μ M ALLN, 50 μ M Chloroquine als Inhibitor lysosomaler Enzyme, 40 μ M Bestatin, 500 μ M EDTA. w/o = ohne Behandlung. FLAG-MAX Konstrukte wurden im Western Blot mit Anti-FLAG Antikörper nachgewiesen und Anti-β-Aktin diente als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa.

3.1.8 Funktionelle Bedeutung des unproduktiven Spleißens unter Hypoxie

Wie gezeigt wurde, sind die beiden Isoformen C und E unproduktiv, das heißt, sie führen nicht zu einer nachweisbaren Menge an Protein. Da MAX unter Hypoxie alternativ gespleißt wird und die mRNAs von Isoform C und E ansteigen, scheint die Funktion der Spleißänderung eine Reduktion des Wildtyps zu sein. Da durch das veränderte Spleißmuster zugunsten der alternativen Isoformen gleichzeitig die mRNA des Wildtyps reduziert wird, nimmt auch die Proteinmenge des Wildtyps ab (Abb. 3.15 B). Der Wildtyp kommt in zwei Isoformen p21 und p22 vor, die sich durch das Vorhandensein von Exon 2 unterscheiden. In HUVECs ist die p21 Isoform dominant, aber beide Isoformen sind unter Hypoxie reduziert.

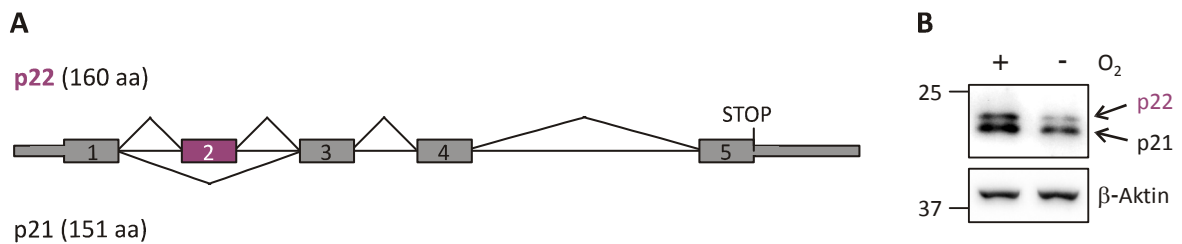


Abbildung 3.15 Reduktion des Wildtyps unter Hypoxie

A Schema der Wildtyp (WT) Isoformen p22 (mit Exon 2) und p21 (ohne Exon 2). Das alternative Exon ist in violett gezeigt. **B** Western Blot der MAX Wildtyp Isoformen p22 und p21 in HUVECs nach 48 h unter Normoxie (+ O₂) und Hypoxie (- O₂). Der Nachweis erfolgte mit dem Anti-MAX Antikörper, der den C-Terminus des Wildtyp Proteins erkennt und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa.

Da es sich bei MAX um einen Transkriptionsfaktor handelt, der gemeinsam mit Interaktionspartnern die Transkription verschiedener Zielgene aktivieren oder reprimieren kann, ist es interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen die Reduktion von MAX auf die Zielgene hat.

MAX selbst besitzt keine Aktivierungsdomäne und kann die Expression von Zielgenen nicht direkt beeinflussen. Jedoch können MAX Homodimere gebildet werden, die still an die Erkennungssequenz der DNA binden. Dadurch stehen weniger freie MAX Proteine zur Interaktion mit MYC bzw. MXD Proteinen zur Verfügung, was schließlich eine veränderte Genexpression provoziert.

Um nähere Einblicke in die Regulation dieses Netzwerks unter Hypoxie zu erlangen, wurde eine Überexpression von MAX in HUVECs unter Normoxie und Hypoxie durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide pCMV-MAX-A und -B verwendet, in denen die CDS von MAX mit Exon 2 (Isoform A/p22) oder ohne Exon 2 (Isoform B/p21) unter Kontrolle eines humanen CMV Promotors überexprimiert wird. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pCMV-MS transfiziert. Je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 500 ng Plasmid elektroporiert. Der Ansatz wurde auf 2 *wells* einer 12-*well*-Platte verteilt, um parallel RNA und Protein analysieren zu können. Anschließend wurden die Zellen zunächst 48 h bei Normoxie inkubiert, um die Viabilität der Zellen nach der Elektroporation zu gewährleisten und um 100% Konfluenz zu erreichen. Dies war nötig, um die gleichen Bedingungen zu gewährleisten, die normalerweise zur Behandlung der Zellen mit Hypoxie verwendet wurden.

Die Überexpression wurde in einem Western Blot überprüft und hat für beide Isoformen mit gleicher Effizienz funktioniert, 1,5fach für MAX p22 und ca. 2,6fach für MAX p21 bei Normierung auf das Referenzgen β -Aktin (Abb. 3.16 A). Hierbei ist anzumerken, dass sich die unterschiedliche Überexpression durch die Normalisierung auf β -Aktin ergibt, welches sich bei überexprimiertem MAX (Vergleich Daten zu *RPLP0*) auch auf mRNA-Ebene ändert. Parallel wurde die Expression von bekannten MYC/MAX Zielgenen mittels qPCR quantifiziert, wobei das Haushaltsgen *RPLP0* als Referenzgen eingesetzt wurde. Jedoch zeigte sich, dass die mRNA-Menge von *RPLP0* bei Hypoxie durch die Überexpression von MAX p21 2fach reduziert wird, bzw. um 14% bei p22 (Abb. 3.16 B). Damit kann *RPLP0* nicht als Referenzgen verwendet werden. Daher wurden weitere Referenzgene getestet, das ribosomale Protein RPL13 und Aktin, jedoch zeigten auch diese keine konstante Expression nach MAX Überexpression (Daten nicht gezeigt).

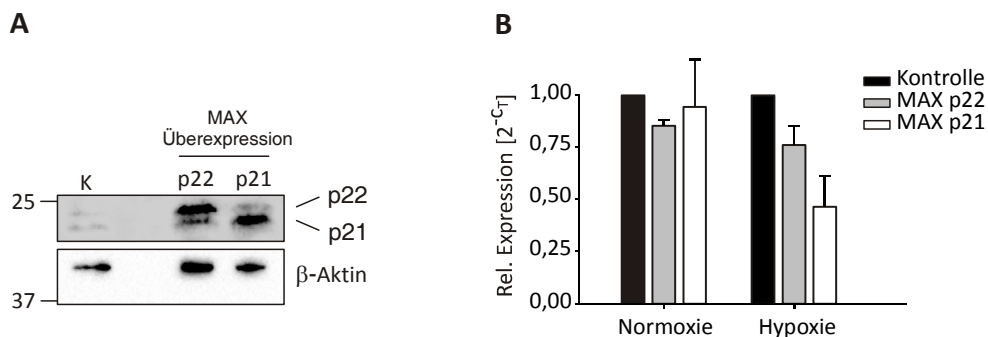


Abbildung 3.16 MAX Überexpression beeinflusst Expression des Haushaltsgens *RPLP0*

HUVECs wurden mit je 500 ng pCMV-MS als Kontrolle und pCMV-MAX-A (p22) oder pCMV-MAX-B (p21) elektroporiert. Anschließend erfolgte 48 h Inkubation bei Normoxie (21%) bzw. Hypoxie (1%). **A** Die Proteinproben wurden auf einem 14%igen Gel aufgetrennt und für 5 min geblottet. Western Blot mit Anti-MAX Antikörper oder Anti- β -Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa. **B** qPCR von *RPLP0*. Gezeigt ist die relative Expression ohne Normierung auf ein Referenzgen. n = 2.

Neben *RPLP0* wurden weitere Gene in der qPCR getestet, die bekannt sind unter der Kontrolle von MYC/MAX zu stehen, dazu gehören beispielsweise die Phosphofruktokinase (PFKL) oder die Ornithin-Decarboxylase (ODC) sowie einige mit dem Zellzyklus in Verbindung stehende Gene (CCND1 und 2, CDK4). Da das Referenzgen *RPLP0* durch die MAX Überexpression beeinflusst wird und nicht verwendet werden kann, erfolgte die Auswertung ohne Normierung auf ein Referenzgen.

Die Überexpression von MAX unter Normoxie (Abb. 3.17 A) bewirkt kaum Änderungen in der Expression von Zielgenen. mRNA-Mengen nach Überexpression mit p21 liegen maximal 10-15% unter der Kontrolle, bei Überexpression mit p22 ist die größte Reduktion für die mRNA von *eIF4E* auf 0,75 zu beobachten. Unter Hypoxie hingegen erfolgt eine stärkere Änderung der Expression nach Überexpression von p21 (Abb. 3.17 B). Die mRNAs der Gene *ODC*, *CDK4* und *PFKL* sind ca. 2fach reduziert, auch *CUL1* und *TRAP* sind um 30 bzw. 40% reduziert. Die Überexpression von p22 zeigt unter Hypoxie keine Änderungen über ca. 15%.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die unter HUVEC stärker exprimierte Isoform p21 an Änderungen in der Genexpression von MYC/MAX Zielgenen unter Hypoxie beteiligt ist. Wie diese Regulation im Detail stattfindet und welche weiteren Zielgene reguliert werden bleibt noch zu klären.

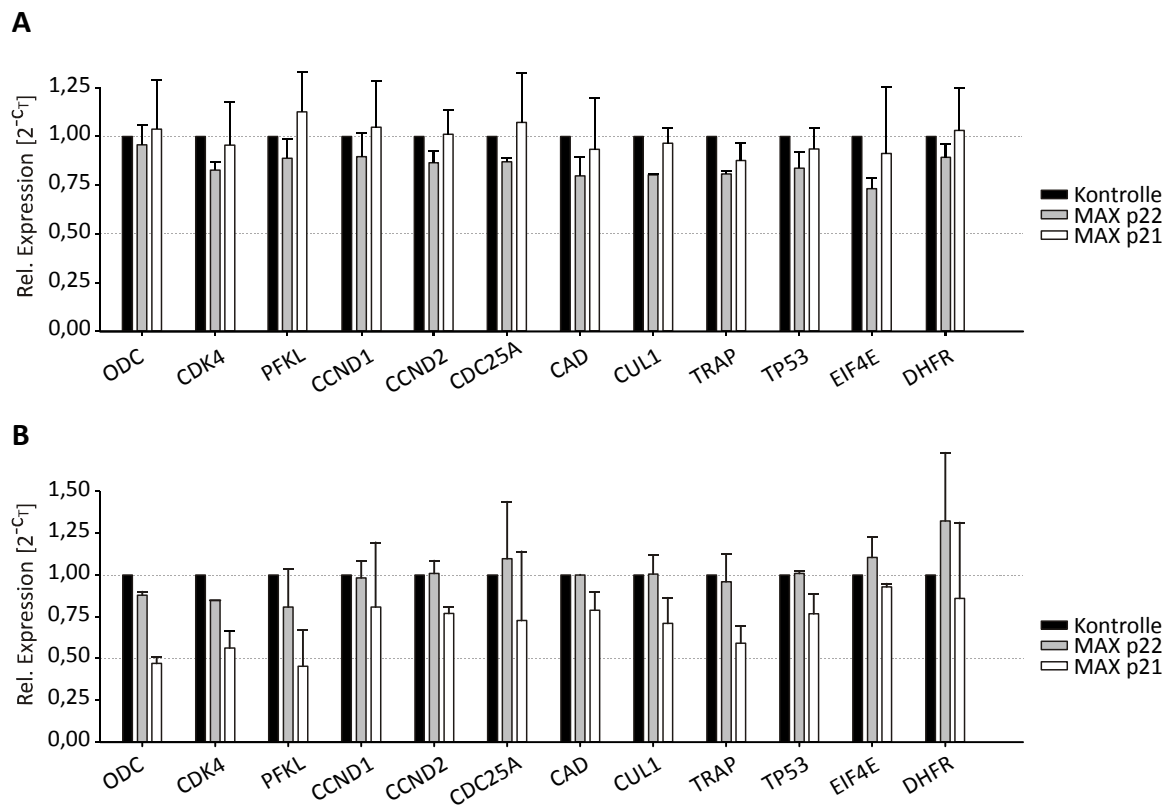


Abbildung 3.17 Zielgenanalyse nach MAX Überexpression in HUVEC

A qPCR von MYC/MAX Zielgenen nach Überexpression unter Normoxie. Gezeigt ist die relative Expression ohne Normierung auf ein Referenzgen. n = 2. **B** qPCR von MYC/MAX Zielgenen nach Überexpression unter Hypoxie. Gezeigt ist die relative Expression ohne Normierung auf ein Referenzgen. n = 2.

3.2 Regulation von hnRNP DL

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das RNA bindende Protein hnRNP DL untersucht. Alternatives Spleißen des Exons 8 von *hnRNP DL* wurde bei einer Studie in Endothelzellen unter CoCl_2 -Behandlung als Hypoxie-Mimik identifiziert⁸⁴. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass das Gen auch auf Hypoxie reagiert und die alternative Isoform ein Ziel des NMD-Mechanismus in HUVEC darstellt und so zu einer Reduktion des Proteins führt⁸⁵. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von hnRNP DL auf die Proliferation in Endothelzellen untersucht. Außerdem wurde die Autoregulation des Proteins in HeLa-Zellen untersucht, die Bindestelle auf der mRNA eingegrenzt, und gezeigt, dass eine Crossregulation mit dem nah verwandten Protein hnRNP D stattfindet.

3.2.1 hnRNP DL beeinflusst die Proliferation in Endothelzellen

Durch die Spleißänderungen von *hnRNP DL* unter Hypoxie in Endothelzellen wird die Proteinmenge von hnRNP DL unter diesen Bedingungen reduziert (Kapitel 2.3.4). Da bekannt ist, dass hnRNP DL einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen ausübt^{69,70}, wurde die hnRNP DL abhängige Proliferation in HUVECs überprüft. Dazu wurde ein transients *knockdown* von hnRNP DL in HUVECs durchgeführt. HUVECs wurden in einer 60 mm Schale ausgesät und 24 h später mit je 60 pmol siRNA (Kontrolle bzw. hnRNP DL) transfiziert. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Zellen abtrypsiniert, in 96-*well*-Platten umgesetzt und nach weiteren 24 h die Zellzahl durch einem Kristallviolett-Assay bestimmt.

Die Effizienz des *knockdowns* nach 48 h zeigt Abb. 3.18 A. Die *knockdown* Zellen zeigen eine Reduktion der Proliferation um ca. 50% (Abb. 3.18 B), sodass von einer Beteiligung des Proteins an der Zellproliferation ausgegangen werden kann.

Weitere Versuche sind jedoch nötig, um diese hnRNP DL abhängige Steigerung der Proliferation zu bestätigen und den dahinterstehenden Mechanismus weiter zu untersuchen.

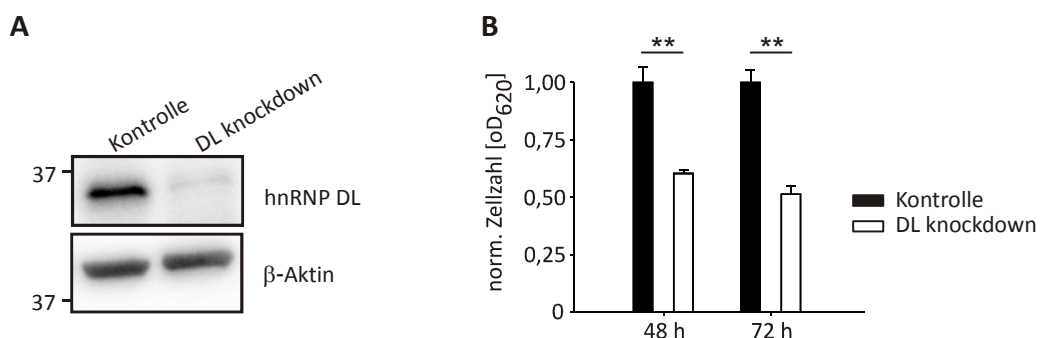


Abbildung 3.18 Der *knockdown* von hnRNP DL in Endothelzellen verringert deren Proliferation

HUVEC wurden mit 60 pmol siRNA transfiziert und nach 48 und 72 h analysiert. **A** Western Blot des hnRNP DL *knockdown* in HUVEC nach 48 h. Nachweis mit Anti-hnRNP DL (Sigma) und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa. **B** Nach 1 bzw. 2 Tagen wurden die Zellen in 96-*well*-Platten überführt und nach weiteren 24 h wurde die Zellzahl mit einem Kristallviolett-Assay bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 620 nm bestimmt. $n = 3$. ** p -Wert $< 0,01$.

3.2.2 hnRNP DL Autoregulation

Es ist bekannt, dass viele Spleißfaktoren das Spleißen ihrer eigenen prä-mRNA in einem negativen *feedback loop* zugunsten einer unproduktiven mRNA beeinflussen, um die Homöostase des Spleißfaktors zu gewährleisten⁴⁶. Für *hnRNP DL* sind zwei mRNA Isoformen bekannt, die sich durch das Vorhandensein von Exon 8 im 3' UTR unterscheiden, hnRNP DL 7/9 (ohne Exon 8) und hnRNP DL 8/9 (mit Exon 8). Der 3' UTR von *hnRNP DL* enthält ein ultrakonserviertes Element, also eine genomische Sequenz, die länger als 200 bp ist und in den Organismen Mensch, Maus und Ratte zu 100% konserviert ist⁴⁸. Das Element umfasst 205 bp und schließt die Sequenz des Kassettenexons 8 ein (Abb. 3.19).

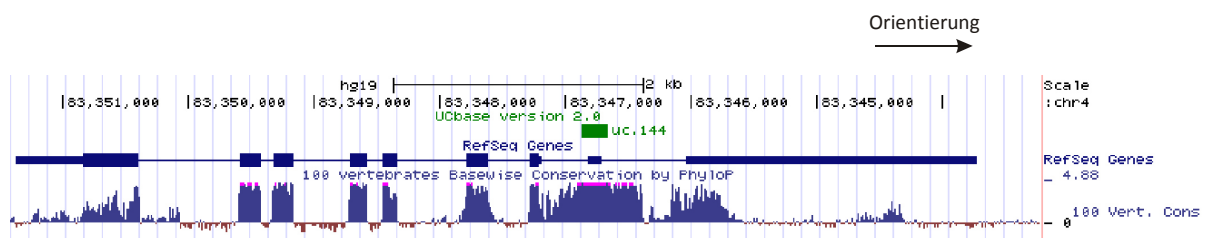


Abbildung 3.19 Ultrakonserviertes Element im 3' UTR von *hnRNP DL*

Gezeigt ist das *hnRNP DL* Gen im UCSC Genome Browser¹¹⁰. Die Exons sind als blaue Boxen dargestellt, die schmälere Boxen sind Exons im nichtkodierenden Bereich. Die Lage des 205 nt langen ultrakonservierten Elements (uc. 144) ist in grün oberhalb der Genstruktur gezeigt und schließt Exon 8 ein. Im unteren Teil der Abbildung ist die Konservierung in Vertebraten gezeigt.

Diese hohe Konservierung im 3' UTR lässt auf eine funktionelle Relevanz des alternativen Exons 8 zum Beispiel im AS-NMD schließen.

Dass hnRNP DL 8/9 in Endothelzellen ein Ziel für den NMD-Mechanismus darstellt, wurde bereits gezeigt⁸⁵. Da eine der beiden Isoformen demnach degradiert wird, wurde hier untersucht, ob hnRNP DL als Spleißfaktor in der Lage ist, das eigene Spleißen in einem negativen *feedback loop* zu regulieren.

Die Untersuchungen wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurde zunächst überprüft, ob hnRNP DL 8/9 auch in HeLa-Zellen ein Ziel für den NMD-Mechanismus darstellt. Anschließend wurde die Autoregulation durch *knockdown*- und Überexpressionsanalysen untersucht und die Bindestelle mit Hilfe eines Minigensystems eingegrenzt.

3.2.2.1 Inklusion von Exon 8 markiert die mRNA für den Abbau durch NMD in HeLa-Zellen

Die beiden mRNA Isoformen von *hnRNP DL* unterscheiden sich durch das Kassettenexon 8 im 3' UTR. Dadurch enthält Isoform 8/9 einen zusätzlichen Exon-Junction-Komplex, der sich > 50 nt hinter dem natürlichen Stopcodon befindet. Damit ist die mRNA ein potentielles Ziel für den NMD-Mechanismus, was nun auch für HeLa-Zellen bestätigt werden soll. Deshalb wurden HeLa-Zellen zum einen mit dem Translationsinhibitor CHX behandelt, zum anderen wurde der NMD-Faktor UPF1 durch einen transienten *knockdown* herunterreguliert. Die Behandlung der Zellen mit CHX erfolgte für 3 bzw. 6 h mit je 100 µg/ml CHX, als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Für den *knockdown* wurden die Zellen mit siRNA gegen UPF1 transfiziert und

die RNA nach 48 h isoliert. Die weitere Analyse erfolgte durch eine qPCR, die mit Isoform spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt wurde. Diese wurden so gewählt, dass das vorwärts gerichtete Oligonukleotid die Exon-Exon-Grenze überspannt. Um die Spezifität der einzelnen Oligonukleotidpaare zu gewährleisten, wurden zunächst alle Fragmente in das pJET Plasmid kloniert und dann eine qPCR mit der richtigen und der zu diskriminierenden Isoform durchgeführt. Daraus konnte die Spezifität abgeleitet werden. Das Oligonukleotidpaar gegen Isoform 7/9 erkennt die richtige Isoform (7/9) 5000fach besser als die zu diskriminierende Isoform 8/9. Das Oligonukleotidpaar 8/9 erkennt die richtige Isoform 8/9 420fach besser als die zu diskriminierende Isoform 7/9. Die Oligonukleotide sind somit Isoform spezifisch und können zur Quantifizierung genutzt werden. Isoform 7/9 bleibt nach der Behandlung mit CHX als auch nach dem UPF1 *knockdown* unverändert, während Isoform 8/9 unter beiden Bedingungen ansteigt (Abb. 3.20). Somit konnte hnRNP DL 8/9 als Ziel für den NMD-Mechanismus in HeLa-Zellen bestätigt werden.

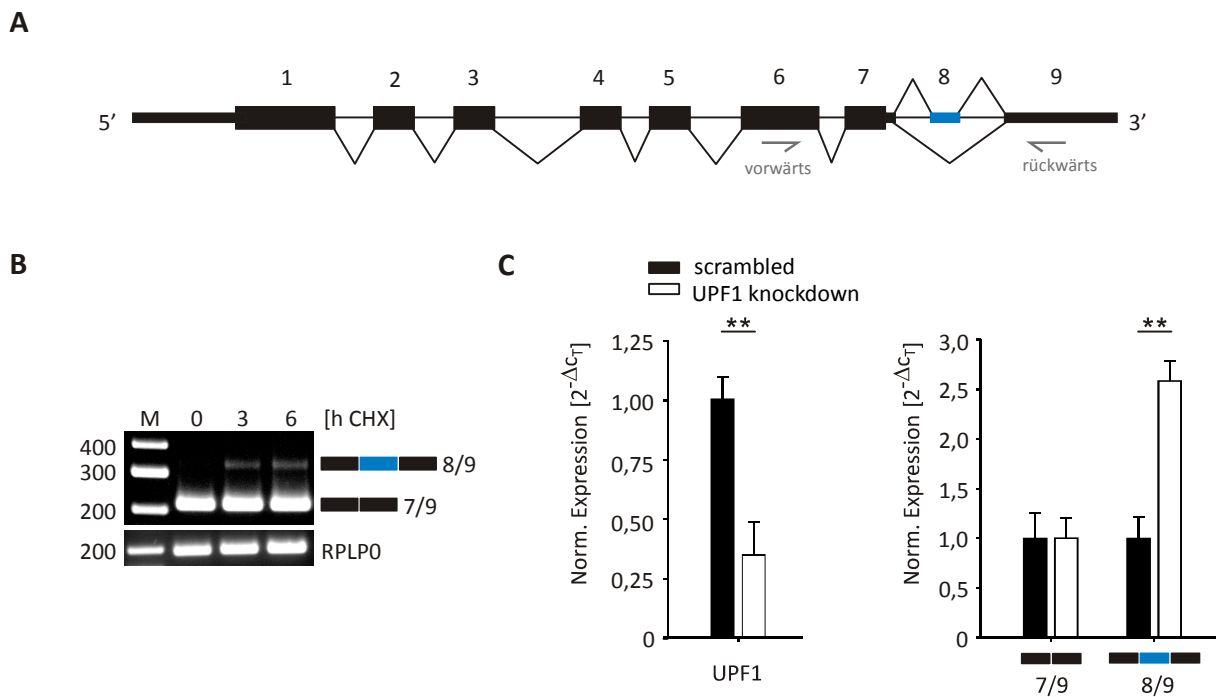


Abbildung 3.20 hnRNP DL 8/9 wird in HeLa-Zellen über den NMD-Mechanismus abgebaut

A Schematische Darstellung der Exons von *hnRNP DL*. Die konstitutiven Exons sind in schwarz gezeigt, das alternative Exon in blau. Nichtkodierende Exons sind als flache Boxen gezeigt, Introns als Strich. Die grauen Pfeile zeigen die Lokalisation der Oligonukleotide für die RT-PCR an. **B** RT-PCR nach einer CHX-Behandlung in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 3 und 6 h mit jeweils 100 µg/ml CHX behandelt. Gezeigt ist eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden aus Abbildung 3.20 A, als Kontrolle ist eine PCR mit dem Referenzgen *RPLP0* gezeigt. **C** qPCR nach transientem UPF1 *knockdown*. HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen UPF1 transfiziert und nach 48 h analysiert. Gezeigt ist die Quantifizierung von *UPF1* (links) sowie die Isoformen hnRNP DL 7/9 und 8/9 (rechts). Die Werte wurden auf *RPLP0* normalisiert. n = 4. ** p-Wert < 0,01.

3.2.2.2 *hnRNP DL reguliert das Spleißen der eigenen prä-mRNA*

Für viele Spleißfaktoren ist bekannt, dass sie das Spleißen der eigenen prä-mRNA regulieren. Da auch *hnRNP DL* durch alternatives Spleißen im 3' UTR eine NMD sensitive mRNA Isoform produziert, wurde getestet, ob *hnRNP DL* selbst das Spleißen zugunsten der unproduktiven Isoform ändern kann.

Um die Änderungen des Spleißverhaltens und die Auswirkungen auf die Proteinexpression testen zu können, wurde eine stabile Zelllinie generiert, die *hnRNP DL* überexprimiert. Dies hat den Vorteil, Änderungen des endogenen *hnRNP DL*s ohne Hintergrund nicht transfizierter Zellen zu analysieren. Um das überexprimierte *hnRNP DL* von dem endogenen unterscheiden zu können, wurde GFP N-terminal an *hnRNP DL* angefügt und beide Proteine durch einen SG4-Linker (SGGG) voneinander getrennt, um eine korrekte Faltung beider Proteine zu gewährleisten. GFP wurde N-terminal angefügt, da gezeigt wurde, dass ein N-terminaler GST-Tag die Funktionalität des Proteins nicht beeinflusst⁷².

Die Sequenz für das Fusionsprotein wurde in das Plasmid pFRT-CD20 kloniert, welches das Protein unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert. Es enthält außerdem eine FRT-Stelle, gekoppelt an eine Hygromycin-Resistenz, sodass das die Sequenz mit Hilfe des Flp-In Systems in HF1-3-Zellen integriert werden kann.

HF1-3-Zellen wurden mit dem Konstrukt pFRT-GFP-*hnRNPD*L und dem Plasmid für die Flp Rekombinase (pOG44) in einem Verhältnis 1:9 transfiziert. Anschließend wurden die positiv integrierten Zellen durch Selektion mit Hygromycin über 3 Wochen angereichert. Als Kontrolle wurden HF1-3-Zellen mit GFP ohne Fusion transfiziert. Die Integration war beendet, als die Zellen konstant gewachsen sind und durch optische Überprüfung am Fluoreszenz-Mikroskop keine GFP negativen Zellen mehr vorhanden waren.

Zur Analyse der Autoregulation wurden Proteinproben aus dem 6-*well*-Format isoliert und anschließend im Western Blot gegen *hnRNP DL* untersucht (Abb. 3.21 A). Durch die Fusion an GFP können das endogene Protein (DL) sowie das überexprimierte GFP-*hnRNP DL* (GFP-DL) anhand des Größenunterschieds unterschieden werden. Dadurch konnte die Intensität der Banden für das endogene *hnRNP DL* bestimmt werden, die eine Reduktion auf ca. 40% der Ausgangsmenge in der Überexpressionslinie verglichen mit der Kontrolllinie ergibt. Parallel wurde RNA aus der Überexpressionslinie und den GFP-Kontrollzellen isoliert und die Menge der kurzen Isoform 7/9 und der langen Isoform 8/9 in einer qPCR bestimmt (Abb. 3.21 B). Die Menge von *hnRNP DL* 7/9 reduziert sich auf 70%, während für *hnRNP DL* 8/9 ein 1,8facher Anstieg bestimmt wurde.

Somit konnte gezeigt werden, dass *hnRNP DL* das Spleißen der eigenen prä-mRNA reguliert. Durch den erhöhten Einschluss von Exon 8 verändert sich das Spleißmuster zugunsten der unproduktiven mRNA Isoform, was gleichzeitig zu einer reduzierten Proteinmenge führt.

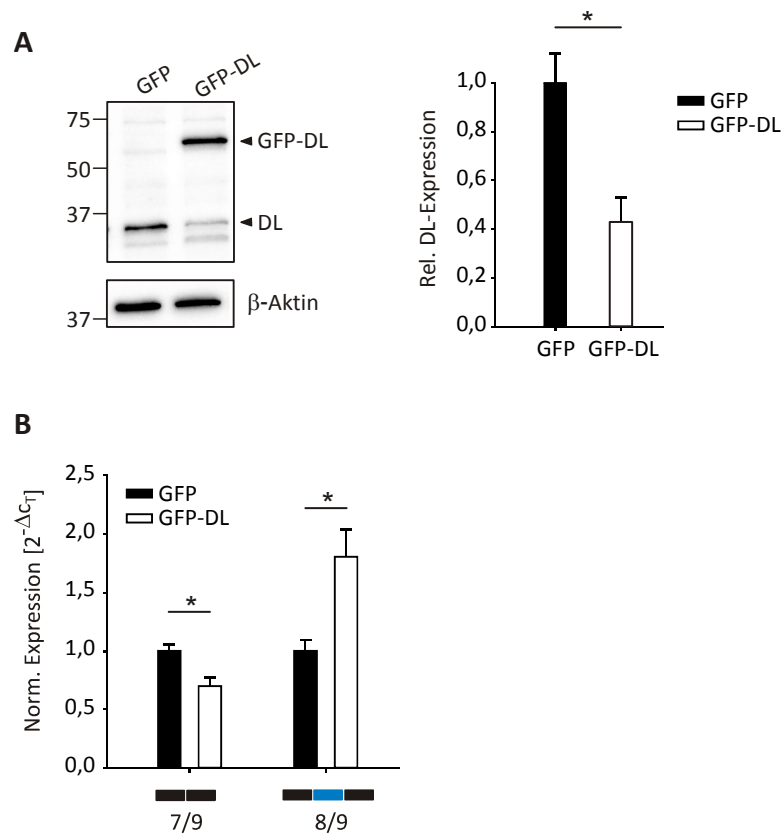


Abbildung 3.21 Autoregulation von hnRNP DL

A Western Blot von hnRNP DL in GFP-hnRNP DL überexprimierenden HF1-3-Zellen (GFP-DL). Als Kontrolle wurde eine GFP überexprimierende Zelllinie (GFP) eingesetzt. Nachweis mit Anti-hnRNP DL (DL) (Santa Cruz) und Anti- β -Aktin als Ladekontrolle. Die Menge für hnRNP DL wurde mit dem Programm Image Lab bestimmt und auf die Menge von β -Aktin normiert. $n = 3$. * p -Wert $< 0,05$. Größenangabe in kDa. **B** qPCR gegen hnRNP DL in GFP-hnRNP DL überexprimierenden HF1-3-Zellen (GFP-DL). Als Kontrolle wurde eine GFP überexprimierende Zelllinie (GFP) eingesetzt. Gezeigt ist die Quantifizierung der Isoformen hnRNP DL 7/9 und 8/9. Die Werte wurden auf *RPLP0* normalisiert. $n = 3$. * p -Wert $< 0,05$.

3.2.2.3 hnRNP DL reguliert das Spleißen der eigenen prä-mRNA im Minigen-Kontext

Um die Regulation des eigenen Spleißens zu testen und isoliert betrachten zu können, wurde ein Minigensystem entwickelt. Dabei wurde der 3' UTR von *hnRNP DL* an das Gen der Firefly-Luziferase in dem Plasmid pDL fusioniert (Abb. 3.22 A). Somit konnte simultan das Spleißmuster sowie das Proteinlevel nach einer hnRNP DL Überexpression unabhängig von einem endogenen Hintergrund bestimmt werden.

Das Verhalten des Minigens wurde nach Überexpression mit hnRNP DL bzw. GFP als Kontrolle in HeLa-Zellen analysiert. Die Überexpression wurde in einem Western Blot überprüft und liegt bei ca. 14fach verglichen mit der Menge des Proteins in der GFP-Kontrolle (Abb. 3.22 B). Das Spleißen nach der Überexpression wurde in einer RT-PCR überprüft (Abb. 3.22 D). Hier sieht man eine deutliche Reduktion von Isoform 7/9, während Isoform 8/9 zunimmt. Da nur die mRNA von Isoform 7/9 zu einem Protein führt, während die mRNA von Isoform 8/9 degradiert wird, können die Änderungen auf Spleißebene auch auf Ebene der Luziferase-Aktivität bestimmt werden. Die Reduktion von Isoform 7/9 spiegelt sich in einer 5fach reduzierten Luziferase-Aktivität wieder (Abb. 3.22 C).

Es konnte also auch im Minigensystem bestätigt werden, dass hnRNP DL das Spleißen der eigenen prä-mRNA zugunsten der unproduktiven mRNA Isoform verschiebt. Um die Bindestelle im 3' UTR von *hnRNP DL* eingrenzen zu können, wurden weitere Minigen-Analysen durchgeführt.

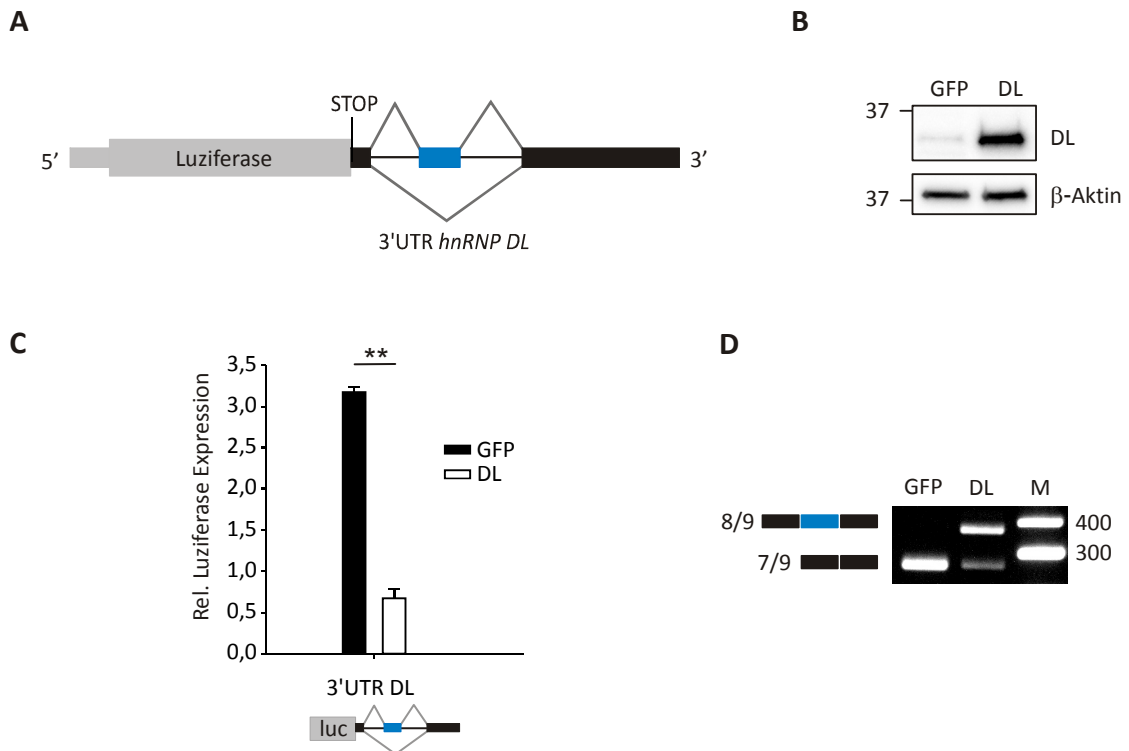


Abbildung 3.22 hnRNP DL reguliert das Spleißen der eigenen prä-mRNA im Minigen-Kontext

A Schema des Luciferase-hnRNP DL Minigen-Konstrukts. Der gesamte 3' UTR von *hnRNP DL* (schwarz und blau) wurde an das Gen der Firefly-Luziferase (grau) in dem Vektor pDL angefügt. Durch alternatives Spleißen können zwei mRNA Isoformen entstehen, die sich durch das Vorhandensein von Exon 8 (blau) unterscheiden. **B** Western Blot der hnRNP DL Überexpression (DL) in HeLa-Zellen. Als Kontrolle wurde GFP (GFP) überexprimiert. Nachweis mit Anti-hnRNP DL (DL) (Santa Cruz) und Anti- β -Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa. **C** Luciferase-Aktivität des Luciferase-hnRNPDL-Minigens (3' UTR DL) sowie der Kontrolle (Luc, Luziferase ohne Fusion) nach Überexpression von GFP als Kontrolle (GFP) und hnRNP DL (DL). Die Aktivität wurde auf die Renilla-Luziferase als Transfektionskontrolle normiert. $n = 4$, ** = p -Wert $< 0,01$. **D** RT-PCR des Luciferase-hnRNPDL-Minigens nach Überexpression mit GFP als Kontrolle (GFP) oder hnRNP DL (DL). Die kurze Isoform (ohne Exon 8) wird als 7/9 bezeichnet, die lange Isoform (mit Exon 8) wird als 8/9 bezeichnet.

3.2.2.4 Eingrenzen der hnRNP DL Bindestelle im Minigensystem

Zur Identifizierung der hnRNP DL Bindestelle wurde das Minigensystem pcAT7-CDMS2A verwendet (Abb. 3.23)¹¹¹. Auf dem Plasmid flankieren zwei konstitutive Exons des *PTPRC* Gens ein alternatives Exon. Dieses Exon kann durch das zu untersuchende alternative Exon mit umliegenden intronischen Bereichen ersetzt werden. Dadurch kann das Spleißen isoliert und *in vivo* betrachtet werden und zum Beispiel durch Überexpression oder *knockdown* der Einfluss bestimmter Spleißfaktoren auf das alternative Exon getestet werden. Bindestellen können durch Verkürzungen, Deletionen oder Mutationen eingegrenzt und bestätigt

werden. Die Inklusion des Exons wird anschließend durch ein Oligonukleotidpaar in den konstitutiven Bereichen untersucht. Die Expression erfolgt unter Kontrolle eines Act/Glo Promotors und gewährleistet somit eine physiologische Expression. Da keine translationsfähige mRNA entsteht, erfolgt kein Abbau durch den NMD-Mechanismus, wodurch das tatsächliche Spleißmuster analysiert werden kann.

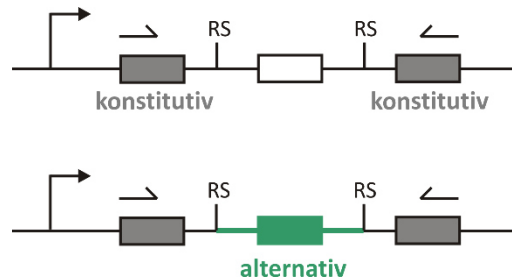


Abbildung 3.23 Übersicht des pcAT7-CDMS2A Minigens

Zwei konstitutive Exons des *PTPRC* Gens (grau) flankieren ein alternatives Exon (weiß). Durch Verwendung zweier Restriktionsschnittstellen (RS) kann dieses alternative Exon gegen ein anderes zu untersuchendes ausgetauscht werden (grün). Dabei werden auch umliegende intronische Sequenzen eingefügt (grüne Linie). Mit einem Oligonukleotidpaar in den konstitutiven Exons kann die Inklusion des Exons untersucht werden. Minigen nach¹¹¹.

Das Minigensystem pcAT7-CDMS2A wurde zur Untersuchung des alternativen Exons von hnRNP DL verwendet. Eine Übersicht gibt Abbildung 3.24. Der eingebrachte Bereich von *hnRNP DL* ist grau hinterlegt und wurde über die Schnittstellen *BsrGI* und *BglII* in das Plasmid pcAT7-CDMS2A eingefügt.

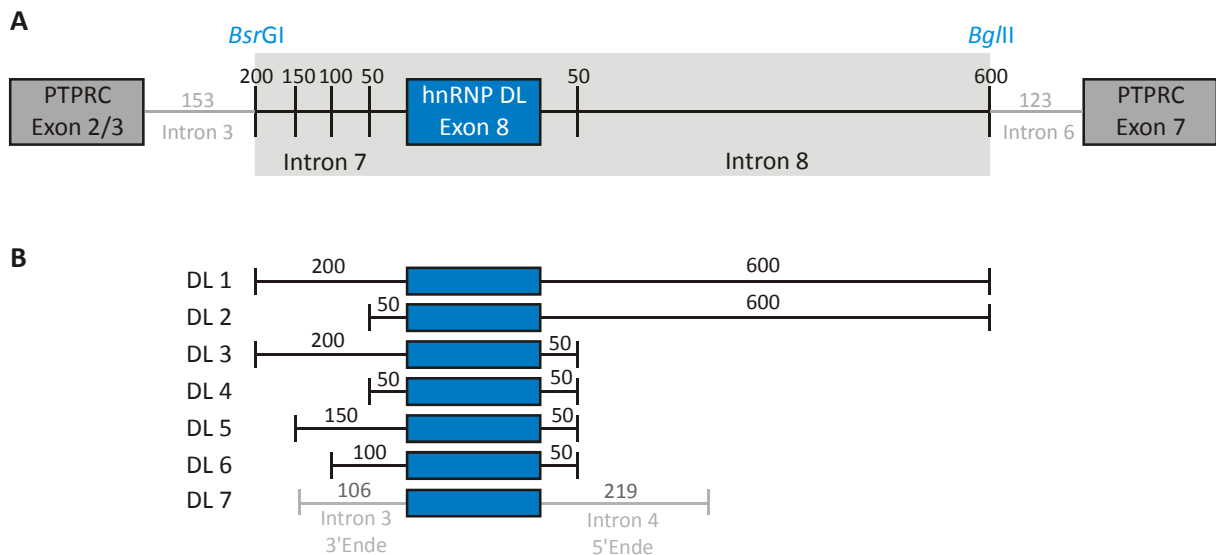


Abbildung 3.24: Übersicht der pcAT7-DL-Konstrukte

A Das Minigensystem beinhaltet 2 konstitutive Exons (Boxen) des *PTPRC* Gens mit flankierenden Introns (grau). Über die Schnittstellen *BsrGI* und *BglII* wurde das alternative Exon 8 von *hnRNP DL* (blau) mit unterschiedlich langen, flankierenden Bereichen der Introns (Striche) eingefügt. Die Zahlen über den Introns geben die Länge der eingefügten Bereiche an. **B** Bereich zwischen den Schnittstellen *BsrGI* und *BglII* der Konstrukte hnRNP DL 1-7. *hnRNP DL* Exon 8 ist blau, *hnRNP DL* Introns sind als schwarze Linien, *PTPRC* Introns als graue Linien gekennzeichnet.

Die umliegenden Bereiche von Exon 8 wurden so gewählt, dass alle regulatorischen Elemente, die an dessen Spleißregulation beteiligt sind, auch in dem Minigen enthalten sind. Intronische regulatorische Elemente liegen meist bis zu 200 nt auf- oder abwärts von dem Exon¹¹². Bei dem initialen Konstrukt DL 1 wurde deshalb das Exon mit 200 nt von Intron 7 sowie 600 nt von Intron 8 in das Minigensystem eingebracht. Dabei wurde die natürliche Länge der Introns, Intron 7 hat eine Länge von 369 nt und Intron 8 eine Länge von 679 nt, berücksichtigt. In den Konstrukten DL 2 und DL 3 wurde jeweils einer der Bereiche auf 50 nt verkürzt. In DL 4 sind die Bereiche beider Introns auf 50 nt gekürzt. Diese 50 nt sollten erhalten bleiben, um das Vorhandensein der 5' und 3' SS zu garantieren.

Die Minigene DL 1-4 wurden in HeLa-Zellen mit und ohne Überexpression von hnRNP DL getestet. Bei Vorhandensein der Bindestelle im Minigensystem wird eine Änderung des Spleißens zugunsten der langen Isoform erwartet. Die Konstrukte wurden parallel mit dem Überexpressionsplasmid für hnRNP DL bzw. GFP als Kontrolle transient in HeLa-Zellen transfiziert. Anschließend wurde das Spleißmuster der Minigene überprüft (Abb. 3.25).

DL 1 zeigt ohne Überexpression ein gleiches Verhältnis der kurzen und langen Isoform, dieses wird durch die Überexpression zugunsten der langen Isoform (+ E8) verschoben. Dies bestätigt, dass die hnRNP DL Bindestelle in dem Bereich 200 nt abwärts der 3' SS und 600 nt abwärts der 5' SS enthalten ist. Eine erhöhte Anwesenheit der Isoform 8/9 im Vergleich zu dem endogenen Verhältnis, bei dem hauptsächlich die kurze Isoform nachgewiesen wird, kann durch die fehlende Degradation im NMD-Mechanismus dieser mRNA erklärt werden, da das Minigen keine translationsfähige mRNA produziert. Außerdem können Bindestellen für andere Spleißfaktoren in den umliegenden Bereichen vorhanden sein, die das Verhältnis der Isoformen beeinflussen. Bei DL 3 ist ebenfalls ein hnRNP DL abhängiger Effekt zu sehen. Dies grenzt die Bindestelle von hnRNP DL ein und zeigt, dass sie sich nicht in Intron 8 von 50 bis 600 nt abwärts der Spleißstelle befindet. Die Reaktion der Konstrukte DL 2 und DL 4 auf die hnRNP DL Überexpression lässt sich nicht auswerten, da bereits in der Kontrolle fast ausschließlich die Isoform mit Exon 8 (+ E8) gebildet wird und somit kein weiterer Anstieg dieser Isoform mehr beobachtet werden kann. Diese Verschiebung könnte an dem Wegfallen einer unabhängigen *Silencer* Sequenz in Intron 7 (zwischen 200 und 50 nt aufwärts der Spleißstelle) liegen.

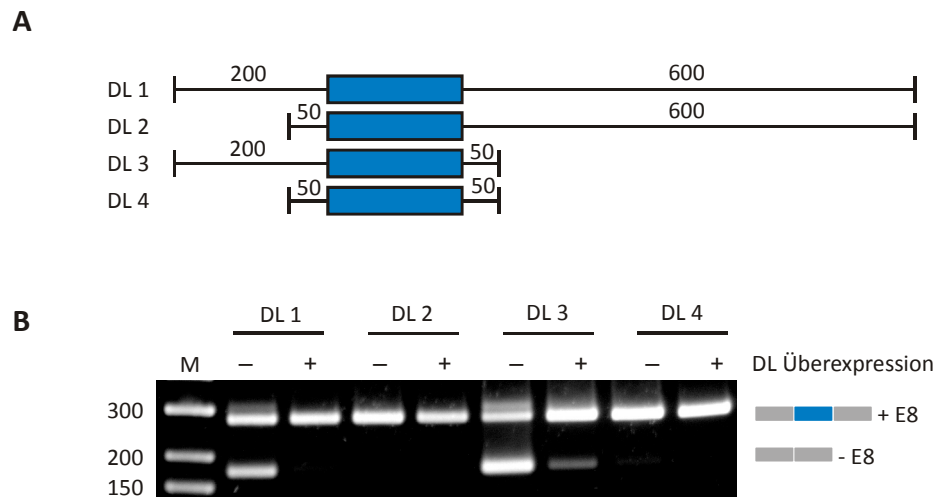


Abbildung 3.25 Eingrenzen der hnRNP DL Bindestelle im Minigensystem mit den Konstrukten DL 1-4

A Übersicht der in pcAT7-CDMS2A eingebrachten Sequenz von *hnRNP DL*. Blau zeigt Exon 8 von *hnRNP DL*, die schwarzen Striche davor kennzeichnen Intron 7, die Striche dahinter Intron 8. Die Zahlen geben die Länge der umliegenden Bereiche an.

B Minigen-Analyse in HeLa-Zellen nach hnRNP DL Überexpression. Die Konstrukte DL 1-4 wurden in HeLa-Zellen transfiziert und parallel dazu entweder hnRNP DL (+) oder GFP (-) als Kontrolle überexprimiert. Nach 24 h wurde das Spleißmuster analysiert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die im konstitutiven Bereich der mRNA binden und Plasmid spezifisch sind. - E8 bezeichnet dabei die mRNA, in der Exon 8 nicht vorliegt, während + E8 das Vorhandensein von Exon 8 auf der mRNA angibt. M = Größenstandard in bp.

Damit sekundäre Effekte, die möglicherweise durch die hnRNP DL Überexpression entstehen, ausgeschlossen werden können, wurde das Spleißverhalten von DL 1 ebenfalls nach einem transienten hnRNP DL *knockdown* überprüft. Dazu wurde das Minigen zusammen mit der siRNA gegen *hnRNP DL* in HeLa-Zellen transfiziert. Der *knockdown* wurde nach 24 h im Western Blot überprüft (Abb. 3.26 A) und beträgt nach Quantifizierung der Bandenintensität ca. 50%. Parallel dazu wurde das Spleißmuster analysiert (Abb. 3.26 B). Das Verhältnis der Isoformen verschiebt sich durch den hnRNP DL *knockdown* zugunsten der kurzen Isoform (- E8) und zeigt damit den gegenteiligen Effekt der Überexpression.

Dies bestätigt die Ergebnisse, dass hnRNP DL das Spleißen der eigenen prä-mRNA reguliert und deutet auf ein *Enhancer* Element hin, welches durch Binden von hnRNP DL das Spleißen zugunsten der unproduktiven Isoform ändert.

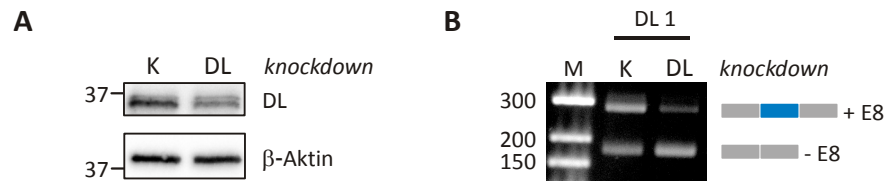


Abbildung 3.26 hnRNP DL *knockdown* fördert Exklusion des alternativen *hnRNP DL* Exons

A Western Blot nach hnRNP DL *knockdown*. Das Minigen DL 1 sowie die siRNA gegen *hnRNP DL* (DL) oder eine Kontroll-siRNA (K) wurden in HeLa-Zellen kotransfiziert. Nach 24 h wurde die Effizienz des *knockdowns* überprüft. Nachweis mit Anti-hnRNP DL (DL) (Santa Cruz) und Anti-β-Aktin als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa. **B** RT-PCR des DL 1 Minigens nach hnRNP DL *knockdown*. Das Minigen DL 1 (Schema siehe Abbildung 3.25) sowie die siRNA gegen *hnRNP DL* (DL) oder eine Kontroll-siRNA (K) wurden in HeLa-Zellen kotransfiziert. Nach 24 h wurde das Spleißmuster analysiert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die im konstitutiven Bereich der mRNA binden und Plasmid spezifisch sind. - E8 bezeichnet dabei die mRNA, in der Exon 8 nicht vorliegt, während + E8 das Vorhandensein von Exon 8 auf der mRNA angibt. M = Größenstandard in bp.

Um die hnRNP DL Bindestelle weiter eingrenzen zu können, wurden zunächst weitere Verkürzungen von Intron 7 vorgenommen. Die Konstrukte DL 5 und DL 6 wurden ausgehend von Konstrukt DL 3 konstruiert. Intron 7 wurde dafür um je 50 nt verkürzt. DL 5 enthält 150 nt von Intron 7 aufwärts der 3' SS, DL 6 enthält 100 nt (Abb. 3.27 A). Das Spleißverhalten wurde auf die gleiche Weise wie bei DL 1-4 in HeLa-Zellen nach einer hnRNP DL Überexpression untersucht. Dabei zeigte sich, dass beide Konstrukte auf die hnRNP DL Überexpression durch eine erhöhte Inklusion von Exon 8 reagieren (Abb. 3.27). Dies zeigt, dass die Bindestelle von hnRNP DL in den Konstrukten enthalten ist und grenzt die Bindestelle weiter ein.

Um zu testen, ob sich die Bindestelle in den intronischen Bereichen oder in Exon 8 befindet, wurde das Konstrukt DL 7 hergestellt. Hier wurde ausschließlich Exon 8 in das Minigensystem pcAT7-CDMS2A eingebracht, dieses ist flankiert von den *PTPRC* Introns. Nach Überexpression mit hnRNP DL konnte keine Änderung des Spleißens beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Bindestelle nicht in Exon 8 sondern in den intronischen Bereichen lokalisiert ist. Dafür kommen sowohl der Bereich 100-1 nt aufwärts der 3' SS in Intron 7, als auch der Bereich 1-50 nt abwärts der 5' SS in Intron 8 in Frage.

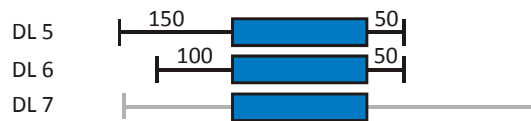
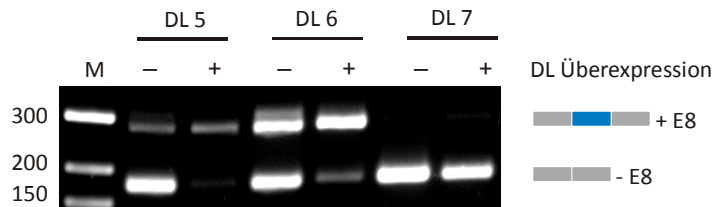
A**B**

Abbildung 3.27 Eingrenzen der hnRNP DL Bindestelle im Minigensystem mit den Konstrukten DL 5-7

A Übersicht der in pcAT7-CDMS2A eingebrachten Sequenz von *hnRNP DL*. Blau zeigt Exon 8 von *hnRNP DL*, die schwarzen Striche davor kennzeichnen Intron 7, die Striche dahinter Intron 8. Die Zahlen geben die Länge der umliegenden Bereiche an. DL 7 enthält Exon 8 von *hnRNP DL*, umliegend sind die Introns von *PTPRC* (grau). **B** Minigen-Analyse in HeLa-Zellen nach *hnRNP DL* Überexpression. Die Konstrukte DL 5-7 wurden in HeLa-Zellen transfiziert und parallel dazu entweder *hnRNP DL* (+) oder GFP (-) als Kontrolle überexprimiert. Nach 24 h wurde das Spleißmuster analysiert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die im konstitutiven Bereich der mRNA binden und Plasmid spezifisch sind. - E8 bezeichnet dabei die mRNA, in der Exon 8 nicht vorliegt, während + E8 das Vorhandensein von Exon 8 auf der mRNA angibt.

3.2.2.5 Interaktion von *hnRNP DL* mit biotinylierter RNA

In Kapitel 3.2.2.4 wurde der Bindebereich von *hnRNP DL* mit Hilfe von Minigenen eingegrenzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Bereich 100-1 nt aufwärts der 3' SS in Intron 7 als auch der Bereich 1-50 nt abwärts der 5' SS in Intron 8 potentielle Bindestellen für *hnRNP DL* darstellen.

Um die Interaktion zwischen *hnRNP DL* und der RNA weiter zu untersuchen, wurde ein Biotin-RNA-Pulldown durchgeführt. Zum einen wurde das Konstrukt DL 6 ausgewählt, da hier im Minigen noch eine Regulation des Spleißens durch *hnRNP DL* stattfindet. Außerdem wurde Exon 8 alleine getestet, um die Ergebnisse der Minigen-Analyse zu bestätigen. Die RNA wurde *in vitro* transkribiert und anschließend mit Biotin am 5' Ende markiert. Dadurch konnte die RNA an magnetische Streptavidin-Dynabeads gekoppelt werden. Für den Pulldown wurde ein Gesamtprotein-Extrakt aus HeLa-Zellen eingesetzt. Nach Inkubation von RNA und Proteinextrakt wurden die nicht-bindenden Proteine durch Waschen entfernt und die gebundenen Proteine schließlich durch Aufkochen im Proteinauftragspuffer von den Dynabeads gelöst. Die Proteine wurden direkt für einen Western Blot eingesetzt und die Bindung mit Antikörpern gegen *hnRNP DL* überprüft (Abb. 3.28). Der Western Blot zeigt eine Bindung von *hnRNP DL* an DL 6, während für Exon 8 keine Bande für *hnRNP DL* nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigt die Ergebnisse der Minigen-Analyse und zeigt, dass die Bindestelle im Intron liegt.

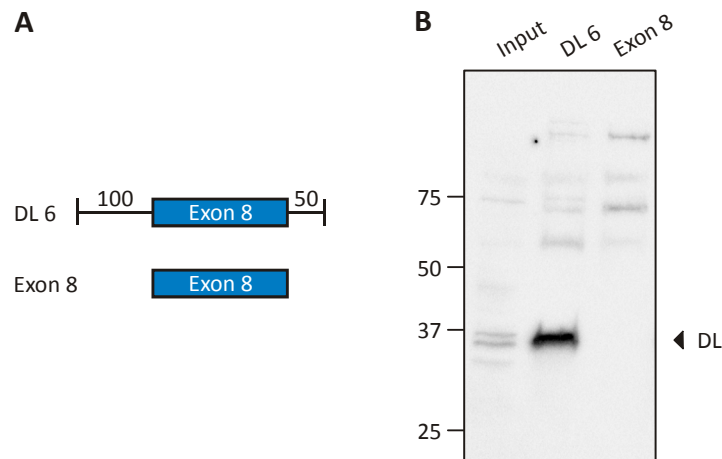


Abbildung 3.28 RNA-Biotin-Pulldown mit HeLa-Zellextrakt

A Übersicht der Konstrukte für RNA-Biotin-Pulldown. Blau zeigt das Exon 8 von *hnRNP DL*, die schwarzen Striche die umliegenden Introns. Die Zahlen geben die Anzahl der Nukleotide der umliegenden Introns an. **B** Western Blot gegen *hnRNP DL* nach RNA-Biotin-Pulldown. Die Konstrukte wurden *in vitro* transkribiert, biotinyliert und an Streptavidin-Dynabeads gekoppelt. Diese wurden dann mit HeLa-Zellextrakt inkubiert und die gebundenen Proteine für einen Western Blot eingesetzt. Nachweis mit Anti-*hnRNP DL* (DL) (Santa Cruz). Als Kontrolle wurden 20 µg HeLa-Zellextrakt aufgetragen (Input).

3.2.2.6 *hnRNP DL* bindet 50 nt auf- oder abwärts der Spleißstellen

Sowohl die Minigen-Analyse als auch ein Pulldown mit biotinylierter RNA zeigen, dass die Bindestelle für *hnRNP DL* in Intron 7, 1-100 Nukleotide aufwärts der 3' SS, oder in Intron 8, 1-50 nt abwärts der 5' SS, liegt. Interessanterweise enthält Intron 7 die Sequenz für ein bekanntes *hnRNP DL* Bindemotiv. Dieses Motiv TTAA ist essentiell für die Bindung von *hnRNP DL* an das IRES Element der *NKRF* mRNA und kommt zweimal in dem Bereich vor der 3' SS vor⁷². Um die Funktion dieser Motive zu überprüfen, wurde das Luziferase-*hnRNP DL* Minigen-Konstrukt (Kapitel 3.2.2.3) verwendet. Durch die Deletion des Bereichs 100-50 Nukleotide vor der 3' SS in Intron 7, der beide TTAA Motive enthält, wurde überprüft, ob sich die *hnRNP DL* Bindestelle innerhalb dieses Bereichs befindet. Entsprechend wurde das Konstrukt Luc-*hnRNPDL*_Δ100-50 (kurz Δ100-50) benannt.

Das Spleißverhalten wurde in HeLa-Zellen nach einer *hnRNP DL* Überexpression untersucht, als Kontrolle wurde der Wildtyp von *hnRNP DL* ohne Deletion (WT) verwendet. Es zeigt sich, dass beide Konstrukte auf die *hnRNP DL* Überexpression durch eine erhöhte Inklusion von Exon 8 reagieren (Abb. 3.29). Dies zeigt, dass die Bindestelle von *hnRNP DL* enthalten ist und diese demnach nicht in der deletierten Sequenz 100-50 nt aufwärts der 3' SS liegt. Die Bindung erfolgt also nicht an eines der beiden TTAA Motive. Die Inklusion von Exon 8 ist hier schwächer als in Abbildung 3.22, was an einer weniger starken Überexpression von *hnRNP DL* liegen könnte. Somit kommen als Bindestellen nur noch die 50 nt auf- bzw. abwärts von Exon 8 in Frage.

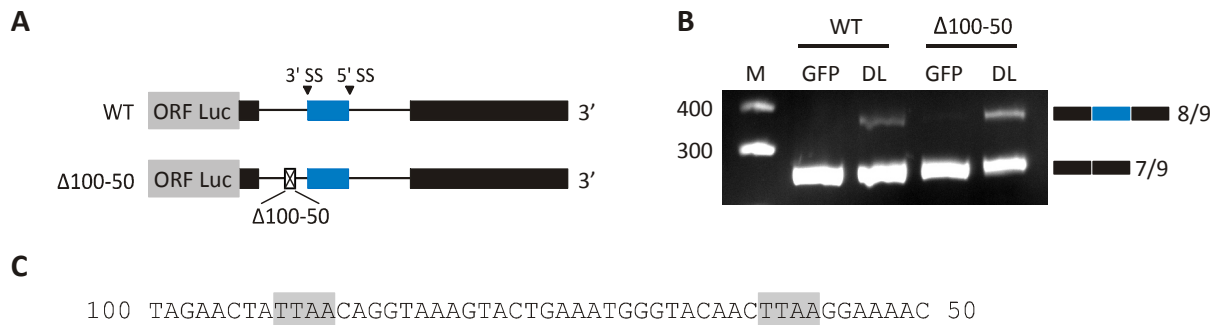


Abbildung 3.29 Eingrenzen der Bindestelle durch Deletion in Intron 7

A Übersicht der pDL-hnRNPD Minigene. Der gesamte 3' UTR von *hnRNP DL* wurde hinter den ORF der Luziferase (ORF Luc, grau) in pDL eingebracht (WT). Δ100-50 gibt den deletierten Bereich vor der 3' SS in Intron 7 an. Blau zeigt Exon 8 von *hnRNP DL*, die schwarzen Striche davor kennzeichnen Intron 7, die Striche dahinter Intron 8. **B** Minigen-Analyse in HeLa-Zellen nach *hnRNP DL* Überexpression. Die Konstrukte WT und Δ100-50 wurden in HeLa-Zellen transfiziert und parallel dazu entweder *hnRNP DL* (DL) oder GFP als Kontrolle überexprimiert. Nach 24 h wurde das Spleißmuster analysiert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die im konstitutiven Bereich der mRNA binden und Plasmid spezifisch sind. 7/9 bezeichnet dabei die mRNA, in der Exon 8 nicht vorliegt, während 8/9 das Vorhandensein von Exon 8 auf der mRNA angibt. **C** Sequenz des deletierten Bereichs in Δ100-50 von *hnRNP DL* in Intron 7. Grau umrandet ist das putative Bindemotiv gezeigt.

3.2.3 Crossregulation von *hnRNP DL* und *hnRNP D*

Eine Crossregulation bekannter *hnRNP* Proteine wurde beispielsweise für die Proteine *hnRNP L* und *hnRNP LL* gezeigt⁵⁶. Hier wurde gezeigt, dass *hnRNP L* das eigene Spleißen sowie das Spleißen von *hnRNP LL* in einem negativen *feedback loop* reguliert. Dadurch wird die reziproke Expression beider Proteine gewährleistet. Es wurde überprüft, ob auch zwischen *hnRNP DL* und dem verwandten *hnRNP D* eine Crossregulation stattfindet. Interessanterweise weist *hnRNP D* dieselbe Organisation des 3' UTRs wie *hnRNP DL* auf. Auch hier ist ein Kassettenexon (Exon 9) lokalisiert, welches bei Vorhandensein in der mRNA diese für den Abbau im NMD markiert⁵³.

Zur Überprüfung wurden die vier Isoformen von *hnRNP D* in das Überexpressionsplasmid pCMV-MS kloniert (Abb. 3.30). Die Isoformen unterscheiden sich durch zwei alternativ gespleißte Exons (Exon 2 und 7).

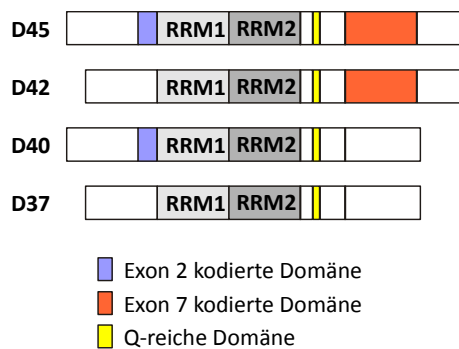


Abbildung 3.30 hnRNP D Isoformen

Die Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein von Exon 2 und Exon 7 und sind nach ihrem Molekulargewicht in kDa benannt. RRM = *RNA recognition motif*. Verändert nach¹¹³.

Außerdem wurde analog zu *hnRNP DL* ein Minigen-Konstrukt mit dem 3' UTR von *hnRNP D* hinter dem Firefly-Luziferase Gen in pDL hergestellt. Somit kann durch eine Kotretransfektion des Minigens mit den Überexpressionsplasmiden und anschließender Luziferase-Messung das Spleißverhalten bestimmt werden. Der Ausschluss des alternativen Exons in beiden UTRs führt zu einer translationsfähigen mRNA, während die mRNA durch den Einschluss des Exons degradiert wird und somit die Aktivität der Luziferase sinkt.

Die Überexpression der verschiedenen hnRNP Proteine war erfolgreich (Abb. 3.31 A). Die Messung der Luziferase-Aktivität zeigt, dass eine Crossregulation zwischen hnRNP D und hnRNP DL stattfindet (Abb. 3.31 B). hnRNP DL reguliert sowohl das Spleißen der eigenen mRNA sowie das Spleißen des alternativen Exons im 3' UTR von *hnRNP D*, sodass die Aktivität der Luziferase etwa 5fach sinkt. hnRNP D45 und D42 sind ebenfalls in der Lage, das Spleißen der eigenen mRNA (5fach bzw. 6,8fach) sowie der mRNA von *hnRNP DL* (4,7fach bzw. 5,6fach) zu regulieren. hnRNP D40 hingegen zeigt weder einen Effekt auf die eigene (1,2fach), noch auf die mRNA von *hnRNP DL* (1,3fach), hnRNP D37 bewirkt in beiden Fällen eine ca. 2fache Reduktion der Luziferase-Aktivität. Diese Ergebnisse konnten durch eine Analyse des Spleißmusters in einer RT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.31 C).

Es findet also eine Crossregulation zwischen den Proteinen hnRNP D und hnRNP DL statt, diese Regulation erfolgt in beide Richtungen. Um die Funktion der gegenseitigen Regulation zu untersuchen, sind jedoch weitere Versuche notwendig.

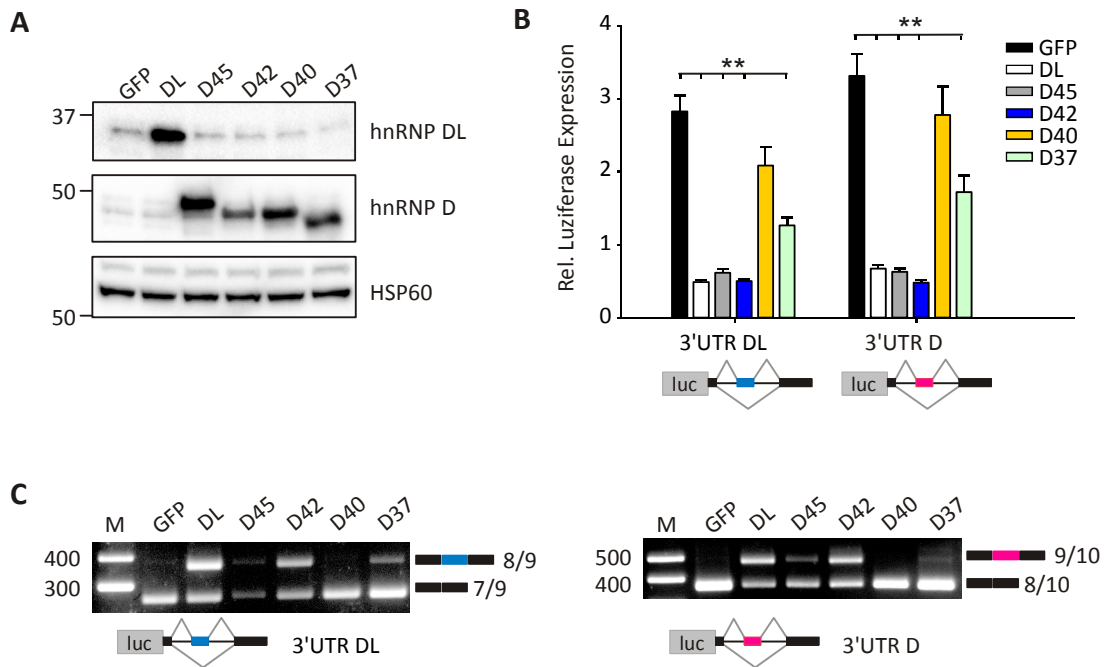


Abbildung 3.31 Crossregulation von hnRNP DL und hnRNP D

A Western Blot der Überexpression von hnRNP DL (DL) und hnRNP D (D45, D42, D40, D37). Nachweis mit Anti-hnRNP DL (DL) (Santa Cruz), Anti-hnRNP D und Anti-HSP60 als Ladekontrolle. Größenangabe in kDa. **B** Luciferase-Aktivität des Luciferase-hnRNPD/hnRNPD-Minigens (3' UTR DL/D) sowie der Kontrolle (Luc, Luciferase ohne Fusion) nach Überexpression von GFP als Kontrolle (GFP), hnRNP DL (DL) und hnRNP D (D45, D42, D40, D37). Die Aktivität wurde auf die Renilla-Luziferase als Transfektionskontrolle normiert. $n = 3$, ** = p -Wert < 0,01. **C** RT-PCR des Luciferase-hnRNPD/hnRNPD-Minigens nach Überexpression mit GFP als Kontrolle (GFP), hnRNP DL (DL) oder hnRNP D (D45, D42, D40, D37). Die kurze *hnRNP DL* Isoform (ohne Exon 8) wird als 7/9 bezeichnet, die lange *hnRNP DL* Isoform (mit Exon 8) wird als 8/9 bezeichnet. Für *hnRNP D* wird die kurze Isoform als 8/10, die lange Isoform als 9/10 bezeichnet.

4 Diskussion

4.1 Alternatives Spleißen von MAX unter Hypoxie

Es wurden zwei mRNA Isoformen von MAX identifiziert, die unter Hypoxie induziert werden. Die initiale Studie war ein Exon Array, der in HUVEC unter Hypoxie durchgeführt wurde⁹². Als erste genomweite Studie unter hypoxischen Bedingungen wurden in Endothelzellen neun Gene identifiziert, die bisher noch nicht in Zusammenhang mit Hypoxie gebracht wurden. MAX ist ein Transkriptionsfaktor und wurde als erstes dieser Gene näher untersucht.

Die beiden Isoformen (Isoform C und E) steigen unter Hypoxie 6fach (Isoform C) bzw. 3fach (Isoform E) an und kodieren für Proteine mit einem verkürzten C-Terminus (Abb. 3.3). Beide Isoformen wurden bereits in früheren Studien identifiziert^{103,104}. Es wurde gezeigt, dass sie die transformierende Wirkung von c-MYC *in vivo* verstärken, während der Wildtyp sie reduziert¹⁰⁴. Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass Isoform C zum Tumorwachstum in Glioblastom-Zellen beiträgt¹¹⁴. Welche Funktion die Hochregulation beider mRNAs in Endothelzellen unter Hypoxie ausübt, wurde im Folgenden untersucht.

4.1.1 MAX Isoform C wird durch den NMD degradiert

Isoform C wird unter Hypoxie 6fach auf mRNA-Ebene hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass durch das beibehaltene Kassettenexon in Intron 4 ein Abbau der mRNA durch den NMD-Mechanismus stattfindet. Die mRNA wird durch die Exon-Exon-Verknüpfung mehr als 50 nt hinter dem Terminationssignal für den NMD-Mechanismus markiert, dies konnte sowohl durch Behandlung der HUVEC mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid als auch durch einen *knockdown* des NMD-Faktor UPF1 bestätigt werden (Abb. 3.5).

Dies widerspricht den Ergebnissen aus Glioblastom-Zellen. Hier wurde gezeigt, dass Isoform C auf Proteinebene exprimiert wird. Das Protein weist im Vergleich zum Wildtyp einen verkürzten C-Terminus auf und trägt zum Tumorwachstum bei¹¹⁴. Eine mögliche Erklärung für die Expression von Isoform C in Glioblastom-Zellen könnte sein, dass der NMD-Mechanismus während der Gehirn-Entwicklung herunter reguliert ist¹¹⁵. Damit fällt Isoform C eine Funktion unter Bedingungen zu, bei denen der NMD-Mechanismus ausgeschaltet ist. Unter den getesteten Bedingungen in HUVEC wird die mRNA jedoch abgebaut und es kommt nicht zu einer Expression des verkürzten Proteins.

Die Änderung des Spleißens dient also in diesem Fall nicht der Expression eines veränderten Proteins, sondern stellt vielmehr eine Möglichkeit des regulierten, unproduktiven Spleißens dar. Hier wird das veränderte Spleißen unter Hypoxie gezielt dazu verwendet, den Wildtyp zu reduzieren. Dieser auch AS-NMD genannte Mechanismus ist hauptsächlich für Speißfaktoren der SR und hnRNP Familien bekannt¹¹⁶, kommt darüber hinaus aber auch bei anderen Genen vor¹¹⁷.

4.1.2 MAX Isoform E kodiert ein instabiles Protein

Intron Retention

Die mRNA von Isoform E entsteht durch ein beibehaltenes Intron (Intron 4). Dadurch entsteht ein Protein mit verkürztem und verändertem C-Terminus. Die mRNA von Isoform E ist 3fach induziert unter Hypoxie in Endothelzellen. Intron Retention galt bisher als das seltenste Spleißereignis¹¹⁸, jedoch wurde vor kurzem deutlich, dass es als weit verbreiteter Mechanismus in Säugetierzellen vorkommt und hier als Regulationsmechanismus zur Feinregulierung der Genexpression dient¹¹⁹. Der Mechanismus der Intron Retention kontrolliert beispielsweise die Granulozyten-Differenzierung sowie die entwicklungsspezifische Genexpression^{120,121}.

Fehlende Proteinexpression

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurde eine Fusion der CDS von Isoform E an einen FLAG-Tag zur erleichterten Proteindetektion gewählt. Interessanterweise konnte bei Überexpression von FLAG-E kein Protein in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Diverse Kontrollen bestätigten die fehlende Expression des Proteins, wobei die mRNA in hoher Abundanz nachgewiesen wurde (Abb. 3.6).

Interessanterweise ist die mRNA-Menge von Isoform E nach Transfektion mit gleichen DNA-Mengen ca. 2fach reduziert (Daten nicht gezeigt). Für die gezeigten Experimente wurde deshalb eine erhöhte DNA-Menge transfiziert, da nur bei gleichen mRNA-Mengen Unterschiede in der Proteinexpression betrachtet werden können. Diese Reduktion deutet darauf hin, dass ein kotranslatationaler Kontrollmechanismus wie der NMD, der *Non-Stop-decay* (NSD) oder der *No-go decay* (NGD) die mRNA bei der Translation für den Abbau markieren und somit kein Protein entsteht¹²². Jedoch erfüllt die mRNA von Isoform E nicht die Kriterien, die sie zum Abbau markieren. Es fehlt ein vorzeitiges Stopcodon, das den Abbau im NMD auslöst und auch bei Behandlung der Zellen mit CHX oder *knockdown* des NMD-Faktors UPF1 ändert sich die mRNA Menge für Isoform E nicht (Abb. 3.5). Außerdem ist ein Terminationssignal vorhanden, sodass ein Abbau im NSD nicht in Frage kommt. Der NGD wird durch verlangsamte Ribosomen eingeleitet, was durch Polylysine Codons, RNA Hairpin Strukturen oder seltene Codons ausgelöst wird, keines davon trifft für Isoform E zu. Außerdem spricht die erfolgreiche Translation bei Fusion an GFP und die reduzierte Halbwertszeit bei Fusion der Isoform E spezifischen Region an GFP gegen einen kotranslatationalen Abbau der mRNA.

Weiterhin kann ein Fehlen von Isoform E grundlegend durch fehlende Translation oder eine sehr geringe Proteininstabilität, also ein effizienter Abbau des Proteins, erklärt werden. Die Translatierbarkeit wurde in einem *in vitro* Ansatz bestätigt (Abb. 3.6), demnach kodiert Isoform E für ein sehr instabiles Protein. Dies wird von Västrik *et al.* bestätigt, die Isoform E bereits als instabiles Protein in Leukämiezellen beschrieben haben¹⁰⁴.

Abbaumechanismus von Isoform E

Für den Proteinabbau in humanen Zellen kommen zwei grundlegende Mechanismen in Frage, der Abbau durch das Proteasom oder der Abbau in Lysosomen. Das Proteasom, welches nicht benötigte, fehlgefaltete oder beschädigte Proteine aus der Zelle entfernt, ist in Eukaryoten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert¹²³. In Isoform E wird der C-Terminus durch das beibehaltene Intron verändert. Dadurch ist der Leucin-

Zipper nicht vollständig, da das letzte Leucin durch Exon 5 kodiert wird und Wildtyp spezifisch exprimiert wird. Dadurch kann Isoform E möglicherweise nicht die natürliche Konformation einnehmen oder die Fähigkeit zur Dimerisierung verloren haben. Als ungefaltetes Protein oder durch einen unstrukturierten C-Terminus könnte Isoform E ein Ziel für den Proteasom vermittelten Abbau darstellen. Zur Markierung werden die Proteine in einem enzymatischen Prozess mit einer Poly-Ubiquitinkette an Lysinresten markiert, die dann vom Proteasom erkannt werden¹²⁴. Da jedoch innerhalb der Isoform E spezifischen Region kein Lysin vorhanden ist, scheint das Protein nicht im Proteasom abgebaut zu werden.

Jedoch gibt es auch einen Ubiquitin unabhängigen Abbauweg, wie er zum Beispiel für die Ornithin Decarboxylase (ODC) beschrieben ist. Hier wird der Abbau durch einen unstrukturierten 37 aa langen Bereich am C-Terminus ausgelöst. Innerhalb dieses sogenannten Degrons sind zwei aa C⁴⁴¹A⁴⁴² für den Abbau essentiell, ein weiteres Element ist am C-Terminus und wenig Sequenz konserviert¹²⁵. Obwohl die Lokalisation am C-Terminus und die Länge des Degradationssignals (37 aa für ODC, 36 aa für Isoform E) mit den der Isoform E übereinstimmen und auch ein konserviertes CA-Dipeptid in Isoform E vorliegt, scheinen die Abbauwege nicht übereinzustimmen. Während die Degradation von ODC vom 26S Proteasom durchgeführt wird und MG132 sensitiv ist¹²⁶, konnte für Isoform E keine Stabilisierung des Proteins unter diesen Bedingungen beobachtet werden (Abb. 3.14).

Neben dem Proteinabbau im Proteasom werden fehlgefaltete Proteine oder ganze Organellen im Lysosom abgebaut¹²⁷. Durch Inhibition dieses Abbauwegs durch Cloroquin, welches die Aktivität der lysosomalen Proteine blockiert, konnte jedoch keine Stabilisierung von Isoform E festgestellt werden (Abb. 3.14), sodass auch ein Lysosomen vermittelter Abbau ausscheidet. Auch durch den Einsatz weiterer Inhibitoren gegen Serinproteasen (AEBSF), Metalloproteasen (Phosphoramidon, Bestatin) oder Cysteinproteasen (Chymostatin, E-64, Leupeptin) konnte keine Stabilisierung von Isoform E festgestellt werden (Abb. 3.14).

Da mit den durchgeführten Experimenten der Abbauweg von Isoform E nicht identifiziert werden konnte, aber ein Abbau durch das Proteasom und das Lysosom ausgeschlossen werden konnte, sind weitere Experimente notwendig. Ein experimenteller Ansatz könnte ein Pulldown-Assay sein. Dabei bietet es sich an, FLAG-E zunächst *in vitro* zu translatieren. Alternativ kann das Protein auch in *E. coli* exprimiert und anschließend, zum Beispiel über einen FLAG-Tag, aufgereinigt werden. Das Protein wird mit HeLa-Gesamtzellextrakt inkubiert, sodass die am Abbau beteiligten Proteine binden können. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen den FLAG-Tag werden die Proteinkomplexe isoliert und können in der Massenspektrometrie analysiert werden. Durch die Identifikation beteiligter Proteine könnte der Abbaumechanismus aufgeklärt werden.

Charakterisierung von Isoform E

Um das Protein von Isoform E exprimieren und charakterisieren zu können, wurde die CDS an GFP fusioniert, da GFP in der Lage ist, Proteine zu stabilisieren¹⁰⁷. Durch die GFP-Fusion wird Isoform E in HeLa-Zellen exprimiert (Abb. 3.8). Jedoch ist Isoform E auch mit GFP-Fusion deutlich schwächer exprimiert als der Wildtyp und es tritt ein Abbauprodukt auf, welches mit dem Antikörper gegen GFP nachgewiesen werden kann.

Lokalisationsstudien zeigen, dass Isoform E sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 3.9), dies war aufgrund der fehlenden NLS in Isoform E zu erwarten. Das Molekulargewicht von Isoform E liegt bei 14,3 kDa (ohne Fusion) und damit weit unter dem Diffusionslimit der Kernporen, das mehr als 60 kDa beträgt¹²⁸,

was die Lokalisation im Nukleus erklärt. Durch Anfügen einer NLS an das FLAG-E Konstrukt können minimale Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 3.9), was für eine Stabilisierung des Proteins im Nukleus und demnach einen Abbauweg im Zytoplasma spricht. Jedoch kann damit nicht erklärt werden, warum die nachgewiesene Proteinmenge bei Expression von Isoform E mit NLS so gering ist im Vergleich zu der Expression des Wildtyps.

Isoform E spezifische Domäne kodiert für ein Degradationssignal

Die Isoform E spezifischen Aminosäuren allein sind ausreichend, um auch heterologe Proteine zu destabilisieren. Dies zeigt sich zum einen durch eine 33fach verringerte Aktivität der Luziferase bei Anfügen der E-spezifischen Region (Abb. 3.11), zum anderen reduzieren die 36 aa auch die Halbwertszeit von GFP von ca. 10 h auf 2 h (Abb. 3.12). Dies bestätigt, dass die geringe Proteinmenge von einem schnelleren Abbau des gebildeten Proteins stammt. Dafür verantwortlich sind unter anderem die letzten 17 aa, bei deren Wegfall sich die Aktivität der Luziferase wieder erhöht. Auch 4 aa, die zwischen Mensch, Katze, Kuh, Ratte und Maus konserviert sind, erhöhen bei Mutation die Aktivität der Luziferase. Jedoch kann das Ausgangslevel auch bei Kombination beider Veränderungen nicht wiederhergestellt werden (Abb. 3.13).

Durch ein Aminosäure-Screening, bei dem je eine aa beispielsweise gegen Alanin getauscht wird, könnte die funktional relevante Region innerhalb der E spezifischen Domäne weiter eingegrenzt werden. Auch ein Sequenzvergleich mit weiteren, weniger verwandten Arten könnte Aufschluss auf die verantwortlichen Bereiche geben. Außerdem stellt die Untersuchung der vorliegenden Konstrukte in anderen Zelltypen einen interessanten Ansatz dar, um die Generalität des Abbaus zu untersuchen.

Die Effizienz der E spezifischen Region ist verglichen mit anderen Destabilisationssignalen, wie der PEST-Sequenz aus der Maus Ornithin Decarboxylase, deutlich stärker. Während die E spezifische Domäne die Aktivität 33fach reduziert, ist die Reduktion durch die PEST-Sequenz nur 7fach (Abb. 3.11). Damit eröffnen sich auch genetische Anwendungsmöglichkeiten ähnlich denen der PEST-Sequenz, um beispielsweise die Halbwertszeit von Reporterproteinen herabzusetzen^{108,129}. Idealerweise sollte die E spezifische Region dafür jedoch zunächst besser charakterisiert werden. Interessant wäre, wie die Halbwertszeit herabgesetzt wird, oder ob das Degradationssignal auch bei N-terminaler Fusion oder innerhalb der CDS aktiv ist. Die Degradationssequenz von ODC befindet sich ebenfalls am C-Terminus und wird durch 37 aa kodiert. Diese Sequenz kann zwar auf heterologe Proteine übertragen werden, ist jedoch nur am C-Terminus aktiv¹²⁵. Interessanterweise vermittelt diese Degradationssequenz auch den Abbau in Nicht-Vertebratenzellen wie bei Hefen¹³⁰ und Pflanzen¹³¹.

4.1.3 Funktionelle Bedeutung des unproduktiven Spleißens unter Hypoxie

Beide unter Hypoxie induzierten MAX mRNA Isoformen sind unproduktiv und bilden kein Protein. Die Änderung des AS unter Hypoxie scheint daher viel mehr dazu zu dienen, die Proteinmenge des WTs herunter zu regulieren. Diese Form zur Reduktion eines Wildtyps durch AS wurde kürzlich auch für MDM4, den negativen Regulator von p53, gezeigt. Die Inaktivierung von p53 wird mit bösartigen Tumoren assoziiert und kann durch die Überexpression von MDM4 ausgelöst werden. Das Transkript der Spleißvariante MDM4-S (ohne Exon 6) wird bei Krebs induziert und das entsprechende Protein wurde in Transfektionsstudien als wirksamer p53 Inhibitor

charakterisiert¹³². In einem *in vivo* Maus Modell hat sich nun gezeigt, dass die MDM4 Variante ohne Exon 6 zwar auf Transkriptebene exprimiert wird, das gebildete Protein hingegen instabil ist und das AS vielmehr zur Reduktion des Volllängenproteins dient^{133,134}. Auch neuere Schätzungen vermuten, dass 68% der alternativen Transkripte, die durch Überspringen von Kassettenexons entstehen, für instabile Proteine kodieren¹³⁵.

Die Reduktion des MAX Wildtyps unter Hypoxie konnte in einem Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.15). Interessanterweise liegt die Reduktion des Proteins bei ca. 50%, während die mRNA Menge des Wildtyps nur um ca. 20% sinkt. Neben dem AS scheint also ein weiterer Mechanismus die Translation oder die Proteinstabilität des Wildtyps zu reduzieren. Die Funktion dieser Reduktion sollte in weiterreichenden Studien näher untersucht werden.

Eine Veränderung der Expression von MAX unter hypoxischen Bedingungen war bisher nicht bekannt. Bei anderen Mitgliedern des MYC/MAX/MXD Transkriptionsfaktor-Netzwerks hingegen ist eine Regulation bekannt. Während MYC auf Ebene der Translation und Proteinstabilität reduziert wird¹⁰⁵, erfolgt eine Induktion des Antagonisten MXD2¹⁰⁶. Durch diese Anpassung werden die aktivierenden MYC/MAX Komplexe gegen reprimierende MAX/MXD Komplexe an den Promotorbindestellen der Zielgene ausgetauscht. So wird ein Umschalten der Zielgene gewährleistet und eine Anpassung an hypoxische Verhältnisse ermöglicht. Welche Rolle eine Reduktion von MAX bei dieser Anpassung spielt, wurde durch eine Überexpression von MAX untersucht. Dazu wurden bekannte Zielgene des MYC/MAX Komplexes in einer qPCR getestet. Eine Auswertung der qPCR Daten erweist sich als schwierig, da die getesteten Referenzgene wie *RPLP0* oder β -Aktin selbst durch die MAX Überexpression beeinflusst werden und somit nicht zur Normalisierung verwendet werden können (Abb. 3.16). Auch andere ribosomale Proteine scheiden als Referenzgene aus, da sie MYC abhängig reguliert werden¹³⁶. Weit verbreitete Referenzgene wie GAPDH oder Cyclophilin scheiden aufgrund ihrer Hypoxie abhängigen Induktion ebenfalls aus¹³⁷.

Bei der Betrachtung der Zielgene ohne Normalisierung unter Normoxie wurde keine Veränderung bei einer MAX Überexpression festgestellt (Abb. 3.17). MAX scheint nicht der begrenzende Faktor unter Normoxie zu sein und für alle Bindungspartner in ausreichender Menge zur Verfügung zu stehen. Unter Hypoxie hingegen wird MAX herunterreguliert und könnte dadurch zum begrenzenden Faktor werden. Durch die Überexpression stehen wiederum genügend MAX Interaktionspartner für das induzierte MXD2 zur Verfügung, sodass die Zielgene schließlich herunterreguliert werden. MXD Proteine werden als MYC Antagonisten bezeichnet, da sie eine große Anzahl gemeinsamer Zielgene aufweisen und diese im Gegensatz zu MYC reprimieren⁹³. Diese MXD abhängige Repression wurde unter anderem für CCND2¹³⁸, CDC25A¹³⁹ und eIF4E¹⁴⁰ bestätigt.

Die beiden Wildtyp Isoformen p21 und p22 unterscheiden sich in einer 9 aa langen Insertion am N-Terminus und unterscheiden sich durch ihre Fähigkeit zur Dimerisierung¹⁰². Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass die vorherrschend exprimierte Isoform p21 in HUVEC auch die funktionell bedeutsamere hinsichtlich der Regulation der Zielgene ist.

Um die Funktion der MAX abhängigen Zielgenregulierung genomweit zu untersuchen, könnte nach Überexpression ein *Deep-Sequencing* erfolgen. Dies verspricht neue Einblicke in eine bisher wenig beachtete Rolle von MAX innerhalb des Transkriptionsfaktor-Netzwerks und wird neue Aspekte der Anpassung von Endothelzellen an hypoxische Bedingungen aufdecken.

4.1.4 Ausblick

Durch AS findet eine schnelle Anpassung an sich ändernde Bedingungen statt. In diesem Fall werden zwei MAX mRNAs unter Hypoxie induziert, die jedoch als unproduktiv bezeichnet werden können. Während Isoform C ein Ziel für den NMD darstellt, handelt es sich bei Isoform E um ein instabiles Protein. Im Fokus der weiteren Forschung sollte der Abbaumechanismus von Isoform E stehen. Der Abbau wird durch eine 36 aa lange Sequenz vermittelt, die auf heterologe Proteine übertragen werden kann. Die Proteine haben eine deutlich reduzierte Halbwertszeit, werden aber weder im Proteasom noch durch Lysosomen degradiert. Somit besteht die Möglichkeit, einen bisher unbekannten Mechanismus des Proteinabbaus zu entdecken, der möglicherweise auch für andere Proteine eine Rolle spielt.

Auch die Rolle von MAX im MYC/MAX/MXD Netzwerk sollte weiter untersucht werden. Der Wildtyp von MAX wird bei Hypoxie in Endothelzellen herunterreguliert und könnte dadurch einen großen Einfluss auf die Expression der Zielgene ausüben. Eine Rolle für MAX, die so bisher noch nicht bekannt ist. Durch eine genomweite Analyse kann der Einfluss auf Zielgene nach einer MAX Überexpression untersucht und somit die MAX abhängige, Zelltyp spezifische Anpassung von Endothelzellen an hypoxische Verhältnisse betrachtet werden.

4.2 Regulation von hnRNP DL

4.2.1 Die Rolle von hnRNP DL bei der Proliferation in Endothelzellen

Das AS von hnRNP DL ändert sich unter Hypoxie zugunsten einer Isoform, die ein zusätzliches Exon im 3' UTR enthält (Isoform 8/9). Diese Isoform stellt durch einen zusätzlichen Exon-Junction-Komplex im 3' UTR ein Ziel für den NMD dar und ist somit ein Beispiel für unproduktives Spleißen und Abbau der mRNA (AS-NMD-Mechanismus). Die Spleißänderung hat eine Reduktion der Proteinmenge unter Hypoxie zur Folge (Abb. 2.7).

Der AS-NMD Mechanismus wurde kürzlich auch für einen weiteren ubiquitären Spleißfaktor, YT521 (*YTH domain containing 1, YTHDC1*), unter Hypoxie bestätigt. YT521 wird in Endometriumkarzinomzellen Hypoxie abhängig alternativ gespleißt und die Isoformen durch den AS-NMD reguliert. Die reduzierte Expression von YT521 ändert dabei das Spleißen der Krebs assoziierten Zielgene BRCA2 (*breast cancer 2*) und PGR (*progesteron receptor*)¹⁴¹.

Die Funktion der Proteinreduktion von hnRNP DL wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines *knockdown* in Endothelzellen untersucht. Der *knockdown* führt hier zu einer reduzierten Proliferation (Abb. 3.18). hnRNP DL reguliert die Proliferation somit nicht nur in Krebszellen^{69,70}, sondern auch in Primärzellen. Die Runterregulation von hnRNP DL durch den AS-NMD-Mechanismus steht dadurch in direktem Zusammenhang mit der Regulation der Proliferation unter Hypoxie. Endothelzellen werden durch Sauerstoffmangel zur Proliferation angeregt, um eine Neubildung von Gefäßen zu induzieren^{1,8}. Bei länger anhaltender Hypoxie (48 h) hingegen werden energieverbrauchende Prozesse herunterreguliert und die Proliferation in HUVECs sinkt während die Apoptose zunimmt^{18,142}. Welche Rolle die Reduktion von hnRNP DL und die damit verbundene reduzierte Proliferation unter Hypoxie einnimmt, sollte deshalb in weiterreichenden Studien untersucht werden.

Eine weitere Frage ist der Mechanismus der Proliferationsaktivierung. In Prostatakrebszellen wird die Proliferation durch eine hnRNP DL abhängige Induktion des *epidermal growth factor-receptor* (EGFR) gesteigert⁶⁹. Jedoch ist EGFR in Endothelzellen nicht exprimiert, sodass es an der hnRNP DL abhängigen Proliferation nicht beteiligt sein kann¹⁴³. Die Regulation der Proliferation in Endothelzellen scheint außerdem unabhängig von dem einzigen bekannten Zielgen *NKRF* zu sein. hnRNP DL aktiviert die IRES abhängige Translation von *NKRF* und erhöht dessen mRNA Stabilität^{72,73}, jedoch ändert sich die mRNA Menge von *NKRF* nicht nach einem *knockdown* von hnRNP DL in HUVEC⁸⁵.

Spleißfaktoren stellen einen interessanten Ansatz in Hinsicht auf therapeutische Ziele in der Krebsforschung dar, wie das Beispiel von SRSF1 zeigt. Der Spleißfaktor SRSF1 fördert die Proliferation von Brustepithelzellen. Eine Überexpression von SRSF1 fördert das AS von BIM und BIN1 zugunsten von Isoformen, die keine anti-apoptotische Funktion mehr ausüben. Außerdem interagiert SRSF1 mit MYC und aktiviert eIF4E. SRSF1 kann Brustkrebs somit direkt oder durch sogenannte *downstream* Effekte fördern und stellt damit ein interessantes Ziel für Therapieansätze dar¹⁴⁴. Dass auch eine entgegengesetzte Regulation möglich ist, zeigt der Spleißfaktor RBM4. Dieser reprimiert die Proliferation vieler Tumorzellen und ist der Gegenspieler von SRSF1 bei der Aktivierung des mTOR Weges. RBM4 induziert das AS der pro-apoptotischen BCL-x Isoform und ist selbst in vielen Krebszellen reduziert¹⁴⁵.

hnRNP DL ist in Krebszellen hochreguliert und fördert deren Proliferation. Gleichzeitig erfolgt eine Reduktion des Proteinlevels unter Hypoxie in Endothelzellen. Wie diese Reduktion sich auf die Anpassung an hypoxische Verhältnisse auswirkt und welche Faktoren für die Regulation der Proliferation verantwortlich sind, sollte in einem genomweiten Ansatz untersucht werden. Auch die Analyse von Bindestellen mit Hilfe eines CLIP (*cross-linking and immunoprecipitation*) würde Aufschluss über die Funktionsweise des Proteins geben.

4.2.2 hnRNP DL Auto- und Crossregulation

Autoregulation und AS-NMD von hnRNP DL in HeLa-Zellen

Das AS von hnRNP DL wurde zunächst in Endothelzellen unter Hypoxie identifiziert. Es wird eine alternative mRNA Isoform unter Hypoxie induziert, die durch den NMD abgebaut wird und somit zu einer Reduktion der Proteinexpression beiträgt.

In HeLa-Zellen konnte nun gezeigt werden, dass hnRNP DL in der Lage ist, das eigene Spleißen in einem autoregulatorischen *feedback loop* zu steuern (Abb. 3.21 und 3.22). Gezeigt wurde dies anhand einer GFP-hnRNP DL-Fusion, die stabil in eine HeLa-Zelllinie eingebracht wurde. Die Fusion an GFP erlaubt die Analyse des endogenen Proteinlevels, da durch den Größenunterschied beide Proteine getrennt voneinander betrachtet werden können (Abb. 3.21).

Der AS-NMD-Mechanismus ist für die meisten Proteine der SR und hnRNP Familien bekannt und ist oft mit ultrakonservierten Elementen verbunden^{46,48}, wie es auch bei hnRNP DL der Fall ist. Die Verbindung von AS-NMD mit einer Autoregulation wurde außerdem für hnRNP L⁵⁶ und PTB¹⁴⁶ bestätigt. Anzumerken ist auch, dass einige Spleißfaktoren einer Autoregulation unterliegen, die NMD unabhängig stattfindet. Gezeigt wurde dies für TDP-43, welches bei hoher Abundanz an den eigenen 3' UTR bindet und durch einen neuen Mechanismus, einer

Kombination aus Spleißänderungen, Auswahl der Poly-Adenylierungsstelle und mRNA Stabilität, die eigene Expression reduziert¹⁴⁷.

Intronic splicing enhancer in hnRNP DL

HnRNP DL reguliert das eigene Spleißen durch die Aktivierung eines Exons im 3' UTR. Für hnRNP DL wurden bisher einige Bindepräferenzen publiziert, jedoch konnte zu keiner der Sequenzen eine Homologie innerhalb des 3' UTR von hnRNP DL gefunden werden^{66,78,81,82}. Deshalb wurde zur Identifizierung der hnRNP DL Bindestelle auf der eigenen prä-mRNA das Minigensystem pcAT7 verwendet. Durch Verkürzungen der Introns auf beiden Seiten des alternativen Exons konnte die mögliche Sequenz schließlich auf 50 nt vor dem Exon bzw. 50 nt hinter dem Exon eingegrenzt werden. Das Binden innerhalb des Exons wurde im Minigensystem und in einem Pulldown ausgeschlossen (Abb. 3.27 und Abb. 3.28).

Eine Bindung innerhalb des Introns passt gut zu veröffentlichten Daten, bei denen hnRNPs beim Binden im Intron das Spleißen aktivieren³⁷. Dies passt auch zu den Daten von Rossbach *et al.*, bei der hnRNP L durch Binden im Intron der eigenen prä-mRNA aufwärts eines schlecht definierten Exons das Spleißen aktiviert⁵⁶. Bindet hnRNP L hingegen im Exon 4 oder 5 von *CD45*, werden diese Exons ausgeschlossen¹⁴⁸.

Intronic splicing silencer Elemente in hnRNP DL

HnRNP DL reguliert das Spleißen der eigenen prä-mRNA, indem es als Aktivator die Inklusion von Exon 8 fördert. Bei normaler Expression von hnRNP DL in HeLa-Zellen ist der Einschluss von Exon 8 geringer und das Verhältnis liegt auf der Seite der kürzeren Isoform.

Dies impliziert, dass ein unbekannter *Silencer* den Einschluss von Exon 8 inhibiert. Interessanterweise wurde bei der Minigen-Analyse in dem pcAT7-System eine Sequenz gefunden, die bei Deletion zu vollständiger Inklusion von Exon 8 führt (DL 2, Abb. 3.25). In diesem Konstrukt wurde der Bereich von Intron 7 aufwärts der 3' SS von 200 nt auf 50 nt verkürzt. Bei den Konstrukten DL 5 und DL 6 zeigte sich noch keine vollständige Inklusion, was für eine *Silencer* Sequenz in der Region 100-50 nt aufwärts der 3' SS spricht. Im Vergleich zwischen DL 5 und DL 6 nimmt die Inklusion durch eine Deletion der Region 150-100 nt aufwärts der 3' SS geringfügig zu, sodass auch innerhalb dieser Region eine *Silencer* Bindestelle liegen könnte.

Als die Sequenz 100-50 nt aufwärts der 3' SS in dem pDL Minigen deletiert wurde ($\Delta 100-50$), um sie als potentielle hnRNP DL Bindestelle zu testen, zeigte sich jedoch keine erhöhte Inklusion. Da die Isoform mit Exon 8 jedoch in diesem Fall NMD sensitiv ist, könnte die Induktion durch den Abbau der mRNA maskiert sein. Die Deletion sollte daher in einem NMD unabhängigen Minigen betrachtet werden, oder es sollte in dem vorhandenen Konstrukt die Luziferase-Aktivität gemessen werden. Eine Reduktion der produktiven Isoform ohne Exon 8 könnte in dem sensitiven Luziferase-System gemessen werden. Möglicherweise wird die *Silencer* Sequenz in dem Kontext des gesamten 3' UTRs wie er in dem pDL System vorkommt auch durch weitere Faktoren kompensiert. Durch die Analyse von DL 7 wird vermutet, dass ein weiteres *Silencer* Element in Exon 8 lokalisiert ist, da das Exon hier nicht eingeschlossen wird.

Ein Spleißereignis ist oft ein Zusammenspiel von verschiedenen *cis* und *trans* Spleißfaktoren. RBM24 ist ein Muskel spezifischer Spleißfaktor und fördert die Inklusion des alternativen Exons des *Naca* Gens. Hierbei wird das AS Muskel spezifischer Exons durch PTB und hnRNP A1/A2 inhibiert, bis RBM24 exprimiert wird und den

Einschluss der Exons fördert¹⁴⁹. Eine genomweite Analyse mehrerer hnRNP Proteine zeigt, dass die meisten AS Ereignisse durch mehrere Faktoren reguliert werden. hnRNPs die an der Spleißregulation beteiligt sind können dabei gemeinsam aktivieren oder reprimieren, aber auch antagonistisch wirken¹⁵⁰.

Durch welchen Faktor Exon 8 in hnRNP DL inhibiert wird, bleibt zu klären. Ein interessanter Ansatz ist dabei der Einsatz eines heterologen Systems, in das zu untersuchende Sequenzen eingebracht werden können, um sie isoliert zu betrachten.

Weitere Experimente zur Identifizierung der hnRNP DL Bindestelle

Die Bindestelle von hnRNP DL wurde auf insgesamt 100 nt eingegrenzt und liegt entweder 50 nt auf- oder abwärts von Exon 8. Zur weiteren Eingrenzung der Bindestelle könnte man die 50 nt abwärts des alternativen Exons weiter verkürzen, zum Beispiel in zwei Schritten mit je 20 nt Verkürzungen, somit würde die 5' SS noch intakt vorliegen. Für die Überprüfung der aufwärts liegenden Sequenz bietet sich die Untersuchung in einem heterologen Minigensystem an. Hierzu könnte man das bestehende pcAT7-System verwenden. Es enthält zwei konstitutive Exons des *PTPRC* Gens und in der Mitte ist das alternative Exon 4 von *PTPRC*. Durch Austauschen der 50 nt auf- oder abwärts des alternativen Exons kann zunächst überprüft werden, ob die Bindestelle von hnRNP DL in einer der beiden Regionen enthalten ist. Gleichzeitig ermöglicht dieser Versuchsansatz eine Aussage darüber, ob die Bindesequenz nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Regulation ist. Anschließend könnten die Sequenzen der hnRNP DL-Regionen von denen eines anderen Gens weiter ersetzt und die Binderegion dadurch weiter eingegrenzt werden. Die Bindung kann dann in einem RNA-Protein-Pulldown bestätigt und durch gezielte Mutationen einzelner Nukleotide die genaue Bindestelle identifiziert werden.

Crossregulation von hnRNP D und hnRNP DL

Obwohl die Familie der hnRNPs eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen ist, gibt es paraloge Paare, die gut konserviert sind. Dazu zählen hnRNP L und LL, PTB/nPTB/ROD1 und auch hnRNP D und DL. Diese Paare scheinen ähnliche Bindepräferenzen aufzuweisen und es wird vermutet, dass sie überlappende, aber nicht redundante Rollen *in vivo* einnehmen¹⁵¹. In *knockdown* Experimenten bestätigt sich, dass Paraloge den Partner funktionell nicht ersetzen können. Auch bei der Regulation des Exon 4 von CD45 sind die Paraloge hnRNP L und LL beteiligt. Bei Mutationen des ESS1 Elements wird die Bindung von hnRNP LL aufgehoben, hnRNP L bindet jedoch weiterhin¹⁵².

Hier wurde gezeigt, dass die beiden Proteine hnRNP D und DL in der Lage sind, das Spleißen der jeweils anderen prä-mRNA zu regulieren um dabei durch Ausnutzen des AS-NMD, die Proteinexpression des Paralogs zu reduzieren (Abb. 3.31).

HnRNP D ist ein nah verwandtes Protein von hnRNP DL und wurde im Gegensatz zu diesem bereits intensiv studiert. Am besten ist hnRNP D bekannt für seine Interaktion mit AU-reichen Elementen im 3' UTR vieler Zielgene, wodurch deren Abbau in der Regel beschleunigt wird¹¹³. Erst kürzlich veröffentlichte CLIP Daten zeigen, dass es sich bei der präferierten Bindesequenz entgegen der Erwartung um GU reiche Sequenzen handelt¹⁵³.

HnRNP D kodiert für vier Protein Isoformen, welche sich durch das Vorhandensein von Exon 2 und Exon 7 unterscheiden (Abb. 3.30). Alle Isoformen enthalten zwei RRM-Domänen sowie ein glutaminreiches Motiv C-terminal von der zweiten RRM-Domäne. Exon 2 reduziert bei Vorhandensein (D40 und D45) die

RNA-Bindeaffinität, während Exon 7 (D42 und D45) die Bildung von Komplexen höherer Ordnung fördert und dabei eine offene Konformation der gebundenen RNA vermittelt¹⁵⁴. Außerdem sind D45 und D42 in den meisten Zelltypen im Nukleus lokalisiert, während D40 und D37 sich im Zytoplasma und im Nukleus befinden¹¹³. Diese Eigenschaften finden sich bei der Crossregulation wieder. D45 und D42 wurden als maßgebliche Regulatoren für die Regulation des Spleißens der eigenen sowie der prä-mRNA von hnRNP DL identifiziert (Abb. 3.31).

Es wurde gezeigt, dass der 3' UTR von hnRNP D fünf Spleißvarianten bildet (Abb. 4.1). Diese entstehen durch das alternative Exon 9 und die umliegenden Introns, die ebenfalls beibehalten werden können. Intron 9 enthält eine AU-reiche Sequenz, die *in vitro* von hnRNP D gebunden wird. Es wird vermutet, dass diese Sequenz *in vivo* zu einer hnRNP D abhängigen Destabilisierung der mRNA beiträgt⁵³. Wird Intron 9 bei gleichzeitigem Beibehalten von Exon 9 entfernt, entsteht ebenfalls eine instabile mRNA, da durch den zusätzlichen Exon-Junction-Komplex ein NMD-Ziel entsteht¹⁵⁵. Damit stellt hnRNP D eine funktionelle Verbindung zwischen zwei mRNA Abbauwegen dar: Zum einen der durch AU-reiche Elemente vermittelte Abbau (AMD), zum anderen der Abbau im NMD.

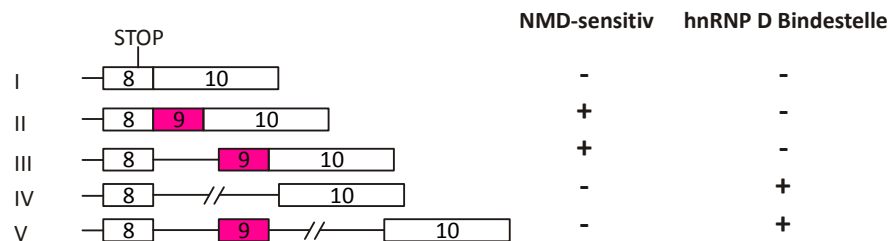


Abbildung 4.1 Mögliche mRNA Isoformen im 3' UTR von hnRNP D

Gezeigt sind die fünf Spleißvarianten im 3' UTR von hnRNP D. Das alternative Kassettenexon 9 ist in pink gezeigt. Durch das Einschließen entstehen entweder NMD sensitive Isoformen, durch einen zusätzlichen Exon-Junction-Komplex hinter dem natürlichen Stopcodon, oder sie enthalten eine hnRNP D Bindestelle (in Intron 9), die den Abbau der mRNA induziert. Boxen stellen Exons dar, Striche Introns. Abbildung verändert nach¹¹³.

Die hnRNP D und DL Gene sind sehr ähnlich organisiert und enthalten ein alternatives Exon in ihrem 3' UTR. Für hnRNP DL wurden jedoch bisher nur mRNAs ohne beibehaltene Introns identifiziert.

Bei der Crossregulation in HeLa-Zellen scheint der für hnRNP D vorgestellte Regulationsmechanismus über den AMD keine Rolle zu spielen. Die Luziferase-Konstrukte wurden durch Fusionieren des gesamten 3' UTRs der beiden Gene generiert. Jedoch konnte bei anschließender Analyse des Spleißmusters mit Oligonukleotiden, die in der Luziferase sowie in Exon 9 (hnRNP DL) bzw. Exon 10 (hnRNP D) lokalisiert sind, keine Isoform mit beibehaltenem Intron amplifiziert werden. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob möglicherweise für die Detektion der anderen Isoformen eine längere Elongationszeit oder mehr Amplifikationsrunden nötig gewesen wären.

Ob beide Proteine an die gleiche Sequenz binden, kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht geschlossen werden. hnRNP D bindet an eine AU-reiche Sequenz im Intron 9, die mit einer reduzierten Luziferase Expression assoziiert wurde⁵³. Diese Region wurde jedoch noch nicht mit dem Spleißen von hnRNP D in Verbindung gebracht. Auch das kürzlich identifizierte Bindemotiv GUUUG für hnRNP D kommt als Bindestelle für beide

Proteine in Frage¹⁵³. Dieses befindet sich interessanterweise 15 nt vor der 3' SS des alternativen Exons in dem 3' UTR von hnRNP D sowie hnRNP DL.

Eine Crossregulation kommt auch bei weiteren Mitgliedern der Spleißfaktoren vor. Bekannte Beispiele sind hnRNP L und LL sowie PTB und nPTB. Die Regulation wird hier ebenfalls durch ein geändertes Spleißmuster mit anschließendem Abbau der mRNA im NMD gewährleistet. Bei hnRNP L und LL wird der NMD durch ein beibehaltenes *poison* Exon mit vorzeitigem Stopcodon ausgelöst. hnRNP L reguliert das Spleißen der eigenen prä-mRNA in einem autoregulatorischen *feedback loop* sowie das Spleißen von hnRNP LL in HeLa-Zellen⁵⁶. hnRNP L ist dabei ca. 10fach höher exprimiert als das regulierte hnRNP LL¹⁵⁶. Ob eine Regulation von hnRNP LL auf L in anderen Zelltypen oder unter anderen Bedingungen stattfindet, ist bisher nicht bekannt⁵⁶. Beide Proteine haben eine Bindepräferenz für CA Dinukleotid-Wiederholungen, jedoch unterscheiden sich die Proteine in ihrer Präferenz für den Abstand zwischen den CA Dinukleotiden. hnRNP LL präferiert die Sequenz CANNCA wodurch die Anzahl der Zielgene eingeschränkt wird. hnRNP L hingegen toleriert eine größere Variabilität bei der Bindesequenz und damit der Zielgene¹⁵¹.

Bei PTB und den Paralogen nPTB (neurales PTB) und ROD1 (hämatopoetisches ROD1) erfolgt die Crossregulation durch den gleichen AS-NMD vermittelten Mechanismus. PTB reguliert sowohl das eigene als auch das Spleißen von nPTB und ROD1. Gleichzeitig reguliert auch nPTB das Spleißen von ROD1⁵⁵.

Unterschiedlich ist hier, dass der Abbau der mRNA durch das Auslassen eines Exons aktiviert wird. PTB sorgt für eine Runterregulation von nPTB in nicht neuronalen Zellen. In neuronalen Zellen hingegen wird eine Zelltyp spezifische Anpassung des Transkriptoms und des AS benötigt. PTB wird reduziert, was wiederum die Mengen von nPTB erhöht, und somit wird die neuronale Differenzierung durch ein Umschalten von PTB zu nPTB gesteuert¹⁵⁷.

Eine Crossregulation in beide Richtungen, wie es für hnRNP D und DL gezeigt wurde, ist bisher noch nicht bekannt. Es stellt sich die Frage nach der Funktion dieser gegenseitigen Regulation. Beide Proteine gelten als ubiquitär exprimiert^{67,168}. Für hnRNP D konnte eine Induktion unter Hypoxie in RCC (*renal cell carcinoma*, Nierenkrebszellen) und 293T Zellen beobachtet werden¹⁵⁸. Ob hnRNP D auch unter Hypoxie in HUVEC induziert wird, wurde bisher nicht untersucht. Jedoch könnte die Induktion von hnRNP D unter Hypoxie für das geänderte Spleißmuster von hnRNP DL verantwortlich sein und das Protein herunterregulieren.

Auch eine Rolle beider Proteine bei der Myogenese könnte untersucht werden. HnRNP D wird in C2C12 Zellen induziert und beeinflusst *MEF2C* (*myocyte enhancer factor 2c*) durch eine Aktivierung der Transkription und Translation¹⁵⁹. Auch hnRNP DL ist induziert in C2C12 Zellen⁸⁰, sodass hier möglicherweise überlappende Funktionen zwischen den Paralogen hnRNP D und DL gefunden werden könnten.

4.2.3 Ausblick

HnRNP DL wird unter Hypoxie zugunsten der unproduktiven Isoform 8/9 gespleißt, außerdem wird das Spleißen der eigenen sowie der prä-mRNA von hnRNP D in einem negativen *feedback loop* reguliert.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Spleißens unter Hypoxie von der Autoregulation unabhängig ist¹⁶⁰. Während die Bindestelle für hnRNP DL in dem Bereich 50 nt auf- oder abwärts des alternativen Exons zu finden ist, erfolgt die Regulation des AS unter Hypoxie in einem distalen Bereich in Intron 8. Das AS von hnRNP DL ist damit auf mindestens drei Mechanismen reguliert. Zum einen die Regulation unter Hypoxie durch bisher unbekannte Spleißfaktoren; eine Beteiligung von dem unter Hypoxie induzierten hnRNP D wurde bisher nicht getestet. Als zweites durch die Autoregulation, für die der Auslöser noch nicht bekannt ist. Und als drittes wird das AS durch hnRNP D beeinflusst, wobei die Bindestelle sowie die funktionelle Bedeutung noch nicht bekannt sind.

RNA bindende Proteine üben vielfältige Funktionen in der posttranskriptionellen Regulation aus. HnRNP DL gehört zu den bisher weniger untersuchten Proteinen der hnRNP Familie. Daher könnte durch genomweite Untersuchungen das regulatorische Netzwerk unter Hypoxie aufgeklärt werden und somit Einblicke in die Regulationsweise des Proteins geschaffen werden. Zur Identifizierung von Bindestellen könnte ein CLIP durchgeführt werden, das außerdem weitere Einblicke in die Spleißregulation und weitere Funktionen von hnRNP Proteinen bietet.

Auch die Hypoxie abhängige Regulation des AS von hnRNP DL bleibt aufzuklären. Durch die Identifikation der verantwortlichen Spleißfaktoren könnten wiederum weitere Zielgene dieses Faktors auf ihre Funktion hin untersucht werden. Nicht zuletzt sollte die Crossregulation zwischen den Paralogen Proteinen hnRNP D und DL näher untersucht werden. Durch genomweite Daten könnten auch hier überlappende Zielgene und dadurch die Funktion des Proteinpaars beispielsweise unter Hypoxie oder während der Myogenese aufgedeckt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 5.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Adenosintriophosphat (ATP)	Roth, Karlsruhe
Adenosin 5'-[γ -thio]triphosphat (ATP- γ -S)	Biomol, Hamburg
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphoese Gel 40)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	peqLab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Biotin (Long Arm) Maleimide	Vector Laboratories, USA
Borat	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumine (BSA)	New England Biolabs, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, USA
Cycloheximid	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	peqLab, Erlangen
Deferoxamin Mesylat (DFO)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glyco Blue (15 mg/ml)	Invitrogen, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, USA
Hygromycin B, Gold Solution	Invivogen, Frankreich
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, USA
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Life technologies, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Bio-Rad, München
Trypton	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invivogen, Frankreich

Tabelle 5.2 Geräte

Gerät	Hersteller
12-Tube Magnetic Separation Rack	New England Biolabs, USA
Axiovert 200	Zeiss, Jena
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank (37°C)	Heraeus Christ, Osterode
Bunsenbrenner	VWR, Darmstadt
Chemidoc	Bio-Rad, München
CO ₂ /O ₂ Inkubator	Binder, Tuttlingen
Elektrophoreseapparatur für Agarose- und Polyacrylamidgele	B. Macht, FAU Erlangen-Nürnberg; Roth, Karlsruhe; C.B.S. Scientific, USA; peqlab, Erlangen; Bio-Rad, München
Electrophoresis Power Supply Consort	peqLab, Erlangen
Eppendorf Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Acculab, USA
Geldokumentation	INTAS, Göttingen
Heizblock	VWR, Darmstadt
Hypoxieschrank, CO ₂ /O ₂ Inkubator	Eppendorf AG, Hamburg
Infinite M200 PRO, Plattenleser	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main; Panasonic
Multifuge 1L-R	Heraeus Christ, Osterode
NanoDrop ND-1000 Spektrophometer	peqLab, Erlangen
Nucleofector 4D	Lonza, USA
NU-6 KL UV-Handlampe	Benda, Wiesloch
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Revolver Tube Rotator	Labnet, USA
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd (UK)
StepOnePlus Real-Time PCR System	Life technologies, USA
Standautoklav Tuttnauer 3870 ELV-3	Tuttnauer, Biomedis, Gießen
Taumelrollenmischer CAT-RM5	CAT M. Zipperer GmbH (Staufen)
TC 10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Thermocycler Primus 25	peqLab, Erlangen
Thermocycler T100	Bio-Rad, München
Tiefkühltruhe (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen

Tiefkühltruhe (-80°C)	Heraeus Christ, Osterode
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Heraeus Christ, Osterode
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage	Acculab, USA
Wasserbad	Julabo, Seelfeld
Wasservollentsalzungsanlage Synergy	Millipore, Frankreich

Tabelle 5.3 Hilfsmittel

Material	Bezugsquelle
Becher, Glas	Schott Duran, Jena
Becher, Kunststoff	Vitlab, Großostheim
Drigalski-Spatel	Roth, Karlsruhe
Einmal-Dispenserspritzen	Greiner, Nürtingen
Einmal-Spritze	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalhandschuhe	Starlab, Hamburg
Einmalpipette (5 ml/10 ml/25 ml)	Nerbe Plus, Winsen
Flachbodenplatte (96er)	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glasplatten (10 cm/20 cm)	CBS, USA
Küvette, Acryl	Sarstedt, Nümbrecht
Messzylinder	Vitlab, Großostheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	peqLab, Erlangen
Petrischalen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Pipetman acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (2; 20; 200; 1000)	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen; Starlab, Hamburg; Nerbe Plus, Winsen
Plexiglasscheiben	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg
Polyethylenröhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgläser	Schott Duran, Jena
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2,0 ml)	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (1,5 ml), Low Binding	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (2 ml), Glas	Supelco, USA
Schikanekolben	Schott Duran, Jena
Schraubflaschen	Schott Duran, Jena
Skalpellklinge	Roth, Karlsruhe
Stericup	Millipore, Frankreich
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht
Zählkammer	Bio-Rad, München

Tabelle 5.4 Kommerziell erhältliche Systeme

System	Bezugsquelle
Zellkultur	
Endothelial Cell Basal Medium (EBM)	Lonza, USA
EGM single quotes	Lonza, USA
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Life technologies, USA
Fetal Calf Serum (FCS), HeLa-Zellen, HF1-3-Zellen	Merck, Darmstadt
Fetal Calf Serum (FCS), HUVEC	Gibco, USA
Flp-In™ System	Life technologies, USA
Lipofectamine™ 2000	Life technologies, USA
Lipofectamine™ 3000	Life technologies, USA
Lipofectamine™ RNAiMAX	Life technologies, USA
Opti-MEM	Life technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Life technologies, USA
P5 Primary Cell Solution	Lonza, USA
Trypsin/EDTA (10x)	Life technologies, USA
Trypsin Neutralization Solution	Lonza, USA
Proteine und Western Blot	
ECL Prime Blocking Reagent	Amersham, USA
ECL Substrat Clarity	Bio-Rad, München
ECL Select Detektionsreagenz	GE Healthcare, England
Mini Protean Precast Gels	Bio-Rad, München
MG132	Sigma-Aldrich, USA
Protease Inhibitor Panel	Sigma-Aldrich, USA
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, USA
Trans Blot Transfer System (PVDF)	Bio-Rad, München
Größenstandards	
peqGold 1 kb DNA-Leiter	peqLab, Erlangen
peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II	peqLab, Erlangen
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, München
Low range ssRNA ladder	New England Biolabs, USA
Kitsysteme	
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Dynabeads® M280 Streptavidin	Life technologies, USA
Maxtract (1,5 ml)	Qiagen, Hilden
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
Weizenkeim-Extrakt	Promega, USA

Tabelle 5.5 Verwendete Enzyme und Proteine

Enzym	Bezugsquelle
Polymerasen	
Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)	Finnzymes, Finnland
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
T7 RNA Polymerase (1,45 mg/ml)	Laboreigene Herstellung
Restriktionsendonukleasen	
AgeI-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
BglII (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
BsiWI (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
BsrBI (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
BsrGI (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
Clal (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
EcoRI-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
HindIII-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
KasI (5 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
MluI (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
NcoI-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
NotI-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
PstI (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
SacI-HF (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
Sall (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
XhoI (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
XbaI (20 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
Weitere Enzyme und Proteine	
Antarktische Phosphatase (5 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
MuLV Reverse Transkriptase (50000 U/ml)	Applied Biosystems, USA
Phosphatase Inhibitor	Roche, Schweiz
RiboLock™ RNase Inhibitor (40000 U/ml)	Fermentas, USA
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega, USA
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	New England Biolabs, USA
Turbo DNase (2 U/ μ l)	Ambion, USA

5.2 Pro- und Eukaryotische Stämme

Tabelle 5.6 Verwendete Pro- und Eukaryotische Zellen

Name	Genotyp/Beschreibung	Referenz
Bakterienstämme		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>hsdR17(rK-, mK-), recA1, endA1, gyrA96, supE44, thi</i>	Sambrook, Molecular Cloning 2001 ¹⁶¹
<i>E. coli</i> Top10	<i>hsdR, mcrA, lacZΔM15, endA1, recA1</i>	Invitrogen, USA
Humane Zellen		
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	DSMZ (ACC 57)
HF1-3	HeLa-Zelllinie mit integrierter FRT Stelle zur Integration mit dem Flp-In System	Berens 2006 ¹⁶²
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>); es handelt sich um Zellen in der Primärkultur	Lonza, USA

5.3 Puffer und Medien

Alle Medien und Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, mit Milli-Q-Wasser (MQ) angesetzt. Wenn notwendig wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt und das Medium autoklaviert.

Tabelle 5.7 Puffer und Medien

Bezeichnung	Komponenten	Konzentration	
LB für Festmedium	Trypton	1% (w/v)	
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)	
	NaCl	1% (w/v)	
	Agar	1,5% (w/v)	
	Ampicillin	100 µg/ml	
50x TAE	Tris	2 M	
	Essigsäure	1 M	
	EDTA	50 mM	
	pH 8,3		
10x TBE	Tris	0,89 M	
	Borat	0,89 M	
	EDTA	10 mM	
	pH 8,3		
6x DNA-Ladepuffer	Tris-HCl pH 7,6	40 mM	
	EDTA	1 mM	
	Essigsäure	20 mM	
	Glycerin	50% (v/v)	
	Bromphenolblau	Spatelspitze	
	Xylencyanol	Spatelspitze	
2x RNA-Ladepuffer	EDTA	25 mM	
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)	
	Xylencyanol	0,1% (w/v)	
	in Formamid, deionisiert		
10x TBS	Tris	200 mM	
	NaCl	1,5 M	
	pH 7,6		
für 1x TBST	Tween20	0,1% (v/v)	
10x (Protein-Gele)	Laufpuffer	Tris	250 mM
		Glycin	1,9 M
		SDS	1% (w/v)
		pH 8,3	
4x Proteinauftragungspuffer (PAP)	Glycerin	50% (v/v)	
	SDS	4% (w/v)	
	2-Mercaptoethanol	15% (v/v)	
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)	
Lyse-Puffer	Tris-HCl, pH 8,0	20 mM	
	EDTA	2 mM	
	NaCl	137 mM	
	Glycerin	10% (v/v)	
	Igepal CA-630	1% (v/v)	
	Proteinase Inhibitor Cocktail	0,5% (v/v)	
RNA-Inkubations-Puffer (RIB)	Tris-HCl pH 7,4	10 mM	
	KCl	150 mM	
	MgCl ₂	1,5 mM	
	DTT	0,5 mM	
	Igepal CA-630	0,05% (v/v)	
frisch hinzugefügt	Ribolock	2,5 µl/ml	

5.4 Oligonukleotide, siRNAs, Antikörper

Tabelle 5.8 Verwendete Oligonukleotidpaare für RT und RT-qPCR

Spezifität	Sequenz des vorwärts Oligonukleotids (5' → 3')	Sequenz des rückwärts Oligonukleotids (5' → 3')	Produktgröße [bp]
CAD	TAGCAAGTTCCTGCGAGTCA	TCGCTGACTGGTTTCACTGT	162
CCND1	GCGGAGGAGAACAACAGAT	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG	178
CCND2	GTGCTGTCTGCATGTTCTG	TGCCAGGTTCCACTTCAACT	152
CDC25A	ATGAGCAACCACTGGAGGTG	GGTAGGGAATGTATTCTTCTCAT AGG	151
CDK4	CCGAAGTTCCTTCTGCAGTCC	ACATCTCGAGGCCAGTCATC	178
CUL1	GGAGGAGCTCAGTTTGTTGG	TCCATTGAGCACTTTGCTTG	171
DHFR	CCTGGTTCTCCATTCTGAG	TGCCACCAACTATCCAGACC	186
EIF4E	ACTCCTAATCCCCGACTACA	CAGGTTTGCTTGCCAAAGTTT	150
FLAG-MAX Isoform C	CAAGTAAAAGGAAATTCCTGTC	ACCCGGGTCAATTATCTATCG	226
FLAG-MAX WT	TGGAGCAGCAAGTCCGTG	ACCCGGGTCAATTATCTATCG	223
FLAG-MAX Isoform E	AAGGCGGGAGGGAAATGAAG	ACCCGGGTCAATTATCTATCG	395
FLAG-MAX total	ACAAAGACGATGACGACAAGC	GGGATGCCTTCTCTCCTTG	177
hnRNP DL (RT-PCR, endogen)	GTGGCTATGGCGGATATGAT	TGTCGTCCTGCAAGATGG	313/208
hnRNP DL 7/9 (qPCR, endogen)	AACATTGGAGAAAAACAGGAGGA G	TGGCAGCTATATACAGTTGGACA	149
hnRNP DL 8/9 (qPCR, endogen)	CGCTGTCCTGTGGAGGAG	TGGCAGCTATATACAGTTGGACA	144
hnRNP DL total (qPCR, endogen)	AGATGCTGCTAGTGTTGATAAG	AGGTTCTTTCCCTTTTAAAGC	103
hRluc mRNA	CTAACCTCGCCCTTCTCCTT	TCGTCCATGCTGAGAGTGTC	220
Luc2 mRNA	GCTCAGCAAGGAGGTAGGTG	TCTTACCGGTGTCCAAGTCC	188
MAX Isoform C1 (C1)	CAAGTAAAAGGAAATTCCTGTC	CTCCATCCGGAGCTTCTTC	194
MAX Isoform C2 (C2)	AAGTAACCACTGGTCCGTG	CTCCATCCGGAGCTTCTTC	193
MAX Isoform C and E	TGGGGAATTCATTCTCTTCC	CTCCATCCGGAGCTTCTTC	231/247 (C) 911 (E)
MAX Isoform E (E1)	CTGAGTGTTAGAGCCGTCCTG	CACTCCAAGGACCTCAAAGC	196
MAX Isoform E (E2)	CAGGACGGTGACATCACAAG	TCCTAAGGGCTTGCTTGTTG	180
MAX Isoform E (P1)	TATTGACGACCTCAAGCGGC	AACCAACCCACTGACACCAC	740
MAX Isoform E (P2)	TCACACCCGCTTTTCTTAC	CTCCATCCGGAGCTTCTTC	972
MAX total	GGGACCACATCAAAGACAGC	GCTGCTCCAGAAGAGCATTC	186
MAX WT	TGGAGCAGCAAGTCCGTG	CTCCATCCGGAGCTTCTTC	191
ODC	GTGGGTGATTGGATGCTCTT	GCTGGCATCCTGTTCTCTA	177
pcAT7-Konstrukte (RT-PCR)	GGGAGCTTGGTACCACGCGTCG ACC	CAGCGCTTCCAGAAGGGCTCAGA GTGG	278/173
pDL-Konstrukte (RT-PCR)	GAGGTGCCTAAAGGACTG	TGGCAGCTATATACAGTTGGACA	360/255
PFKL	ATGTGGGTGCCAAAGTCTTC	GTGCTGGACCAGGTTGTAGG	197
RPLP0	TCGACAATGGCAGCATCTAC	ATCCGTCTCCACAGACAAGG	191
TP53	GTTCCGAGAGCTGAATGAGG	TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT	159
TRAP	TCCATTGAGCACTTTGCTTG	CCTTTCTCGGCATTGGTCT	150
UPF1	CCTTCCCATCCAACATCTTC	AACATCGGTTTATCGGGTTG	112

Tabelle 5.9 Verwendete siRNAs

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
Negativkontrolle	UUCUCCGAACGUGUCACGU [dT][dT]
hnRNP DL	GGGUUAUAACUAUGGGAACU[dT][dT]
UPF1 (HeLa)	GUGUGAAGAAGGGAUUUGA[dT][dT]
UPF1 (HUVEC)	GCAUGUACUCCAGACCCA[dT][dT]

Tabelle 5.10 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Bezugsquelle
Primäre Antikörper		
Anti-hnRNP DL	Hase	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hnRNP DL	Hase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-hnRNP D	Hase	Millipore, Frankreich
Anti-Hsp60	Hase	Abcam, UK
Anti-β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich, USA
Anti-FLAG	Maus	Sigma-Aldrich, USA
Anti-HA	Maus	Roche, Schweiz
Anti-MAX	Hase	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GFP	Maus	Roche, Schweiz
Sekundäre Antikörper (HRP gekoppelt)		
Anti-Hase IgG (H + L)	Ziege	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-Maus IgG (H + L)	Hase	Jackson ImmunoResearch, USA

5.5 Plasmide

Tabelle 5.11 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pCMV-MS	konstruiert aus pGL4.75 zur Proteinüberexpression; CMV _{Prom} ; Amp ^R	Julia Weigand, TU Darmstadt
pCMV-hnRNPD _L _long	CDS von hnRNP DL (Isoform mit langem N-Terminus, 420 aa) hinter P _{CMV} zur Überexpression in pCMV-MS	Katrin Kemmerer, Diplomarbeit 2011
pCMV-MAX-a	CDS von MAX Wildtyp (p22, +Exon 2) in pCMV-MS	Julia Weigand, TU Darmstadt
pCMV-MAX-b	CDS von MAX Wildtyp (p21, -Exon 2) in pCMV-MS	Julia Weigand, TU Darmstadt
pEGFP-N1	EGFP Gen unter CMV _{Prom} ; Kan ^R	Clontech, USA
pFL/PEST	Fusion des Firefly-Luziferase-Gens mit humaner PEST-Sequenz in pMir-Report	Katrin Kemmerer, Diplomarbeit 2011
pFLAG-CMV-6a	Überexpression von FLAG-Fusionsproteinen unter CMV _{Prom} ; Amp ^R	Sigma-Aldrich, USA
pFLAG-CMV-6c	Überexpression von FLAG-Fusionsproteinen unter CMV _{Prom} ; Amp ^R	Sigma-Aldrich, USA
pBI-CMV1	Vektor zur dualen Expression von zwei Proteinen unter einem gemeinsamen <i>Enhancer</i> Element; CMV _{Prom} ; Amp ^R	Clontech, USA
pcAT7-CDMS2A	act/glo Promoter; <i>PTPRC</i> Minigen (Exons 2/3, Exon 4, Exon 7); Zeocin ^R ; Amp ^R	Florian Heyd, FU Berlin ¹¹¹
pDL-hnRNPD _L	3' UTR von <i>hnRNP DL</i> hinter <i>luc2</i> in pDL	Sandra Fischer, Bachelorarbeit 2013
pDLP-hnRNPD	3' UTR von <i>hnRNP D</i> hinter <i>luc2</i> in pDLP	Johannes Braun, Masterarbeit 2014
pGL4.10	Firefly-Luziferase Gen (<i>luc2</i>) unter Kontrolle des CMV _{Prom} ; Amp ^R	Promega, Mannheim
pGL4.75	Renilla-Luziferase Gen (<i>hRluc</i>) unter Kontrolle des CMV _{Prom} ; Amp ^R	Promega, Mannheim
pMR	Ausgangsplasmid für <i>in vitro</i> Transkription; T7 _{Prom} ; Amp ^R	Martin Rudolph, TU Darmstadt
pFRT-CD20	CD20 CDS hinter CMV _{Prom} in pFRT zur stabilen genomischen Integration; Hyg ^R	Kim Beilstein, Goethe Universität, Frankfurt
pFRT-GFP	EGFP CDS hinter CMV _{Prom} in pFRT zur stabilen genomischen Integration; Hyg ^R	Kim Beilstein, Goethe Universität, Frankfurt ¹⁶³
pHDV-N1-delta678	Ausgangsplasmid für <i>in vitro</i> Transkription; T7 _{Prom} ; Amp ^R	Julia Weigand, TU Darmstadt
pOG44	Flp Rekombinase hinter CMV _{Prom}	Thermo Fisher, Flp-In System

Tabelle 5.12 Konstruierte Plasmide

Plasmidbezeichnung	Charakteristika	Kapitel
pcAT7-DL1-DL6	Teile des 3' UTR von <i>hnRNP DL</i> in pcAT7-CDMS2A zur Eingrenzung der Bindestelle: variable Bereiche von Intron 7, Gesamt-Exon 8 und variable Bereiche von Intron 8 zwischen konstitutiven <i>PTPRC</i> Exons	5.6.8
pcAT7-DL7	Exon 8 von <i>hnRNP DL</i> in pcAT7-CDMS2A	5.6.8
pCMV-3xHA-WT	CDS von MAX-WT hinter 3fachem HA-Tag (N-terminal) in pCMV-MS	5.6.4
pCMV-3xHA-E	CDS von MAX-E hinter 3fachem HA-Tag (N-terminal) in pCMV-MS	5.6.4
pCMV-hnRNPD	CDS von hnRNP DL (Isoform 1 mit verkürztem N-Terminus, 301 aa) hinter P _{CMV} zur Überexpression in pCMV-MS	5.6.9
pCMV-hnRNPDΔ6	CDS von hnRNP DL (Isoform 1 ohne Exon 6) zur Überexpression in pCMV-MS	5.6.9
pCMV-hnRNPD45/D42/D40/D37	CDS der hnRNP D Isoformen 45/42/40/37 zur Überexpression in pCMV-MS	5.6.11
pDL	CDS von <i>luc2</i> und <i>hRluc</i> in pBI-CMV1, zur dualen Expression	5.6.1
pDL-E99-117	CDS von MAX-E aa 99-117 hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-E99-117mut	CDS von MAX-E aa 99-117 (4 aa mutiert) hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-E99-134	CDS von MAX-E aa 99-134 hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-E99-134mut	CDS von MAX-E aa 99-134 (4 aa mutiert) hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-WT135-148	CDS von MAX-WT aa 135-148 hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-WT135-160	CDS von MAX-WT aa 135-160 hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-WT149-160	CDS von MAX-WT aa 149-160 hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.6
pDL-hnRNPD	3' UTR von <i>hnRNP D</i> hinter <i>luc2</i> in pDL	5.6.11
pDL-hnRNPDΔ100-50	Ausgehend von pDL-hnRNPD wurden aus Intron 7 50 nt aufwärts von Exon 8 deletiert (nt 100-50 vor 3' SS)	
pDLP	Ausgehend von pDL, destabilisierte Firefly-Luziferase (durch humane PEST-Sequenz)	5.6.2
pEGFP	CDS von <i>eGFP</i> in pCMV-MS zur Überexpression	5.6.5
pEGFP-E	pEGFP Derivat mit CDS von MAX-E hinter EGFP	5.6.5
pEGFP-WT	pEGFP Derivat mit CDS von MAX-WT hinter EGFP	5.6.5
pEGFP/P	Destabilisierung von eGFP (humane PEST-Sequenz), Ausgangsplasmid: pCMV-eGFP	5.6.5
pEGFP/P-E99-134	pEGFP/P Derivat: CDS von MAX-E aa 99-134 hinter EGFP/P	5.6.5
pEGFP/P-WT135-148	pEGFP/P Derivat: CDS von MAX-WT aa 135-148 hinter EGFP/P	5.6.5
pEGFP/P-WT135-160	pEGFP/P Derivat: CDS von MAX-WT aa 135-160 hinter EGFP/P	5.6.5
pEGFP/P-WT149-160	pEGFP/P Derivat: CDS von MAX-WT aa 149-160 hinter EGFP/P	5.6.5
pFLAG-E	CDS von MAX-E in pFLAG-CMV-6a zur Überexpression mit N-terminalem FLAG-Tag	5.6.3
pFLAG-E+E2	siehe pFLAG-E, CDS von MAX-E mit Exon 2	5.6.3
pFLAG-E-NLS	pFLAG-E mit SV40 NLS (C-terminal)	5.6.3
pFLAG-full	CDS von MAX (Exon 1-5) mit Intron 4 in pFLAG-CMV-6a zur Überexpression mit N-terminalem FLAG-Tag	5.6.3
pFLAG-full+E2	siehe pFLAG-full, MAX CDS mit Exon 2	5.6.3
pFLAG-WT	CDS von MAX-WT in pFLAG-CMV-6a zur Überexpression mit N-terminalem FLAG-Tag	5.6.3
pFLAG-WT+E2	siehe pFLAG-WT, CDS mit Exon 2	5.6.3
pFLAG-WT98	pFLAG-WT Derivat: MAX-WT aa 1-98	5.6.3
pFLAG-WT103	pFLAG-WT Derivat: MAX-WT aa 1-103	5.6.3
pFLAG-WT134	pFLAG-WT Derivat: MAX-WT aa 1-134	5.6.3
pFLAG-WT148	pFLAG-WT Derivat: MAX-WT aa 1-48	5.6.3
pFLAG-WT148-NLS	pFLAG-WT148 mit SV40 NLS (C-terminal)	5.6.3

pFRT-GFP-hnRNPD	CDS von hnRNP DL mit N-terminalem GFP in pFRT-CD20	5.6.10
pHDV-hnRNP DL-Exon8	<i>hnRNP DL</i> Exon 8 in pHDV-N1-delta678 zur <i>in vitro</i> Transkription	5.6.7
pIVTL-FLAG-WT	CDS von FLAG-MAX-WT hinter T7 Promotor in pMR zur <i>in vitro</i> Transkription	5.6.7
pIVTL-FLAG-E	CDS von FLAG-MAX-E hinter T7 Promotor in pMR zur <i>in vitro</i> Transkription	5.6.7

5.6 Plasmid Konstruktion

5.6.1 pDL

Das Plasmid pDL wurde generiert, um ein duales Expressionssystem mit zwei Luziferasen zu etablieren. Dabei weisen beide Proteine einen gleich starken Promotor auf und stehen unter einem gemeinsamen *Enhancer* Element, wodurch beide Luziferasen simultan exprimiert werden. Dadurch ist für beide Luziferasen die gleiche Regulation gegeben und unspezifische Effekte gleichen sich aus.

pDL wurde ausgehend von dem Plasmid pBI-CMV1 durch das Einbringen des *luc2* und des *hRluc* Gens generiert. Zunächst wurde das Rückgrat von pBI-CMV1 gegen das von pHDV_tc_IR ausgetauscht, da sich pBI-CMV1 durch zwei Punktmutationen in dem Ampicillin-Resistenzgen sowie dem *ORI* unterscheidet. Beide Plasmide wurden mit *Bsr*BI restringiert und anschließend das Rückgrat von pHDV_tc_IR mit pBI-CMV1 ligiert. Durch umgekehrte Insertion sind beide *Bsr*BI Schnittstellen entfernt worden.

Das *hRluc* Gen wurde von dem Plasmid pGL4.75 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Pst*I in pBI-CMV1 ligiert. Das *luc2* Gen wurde von dem Plasmid pGL4.10 amplifiziert und über die Schnittstellen *Mlu*I und *Not*I in pBI-CMV1-hRluc ligiert. Zur besseren Expression der Renilla-Luziferase wurde ein Startcodon vor dem eigentlichen Translationsstart mutiert (ATG zu AAG). Dafür wurden zwei Oligonukleotide denaturiert und durch langsames Abkühlen hybridisiert. Dieses Hybrid wurde über die Schnittstellen *Eco*RI und *Bgl*II in das Plasmid pBI-CMV1-hRluc-luc2 kloniert und als pDL bezeichnet. Das Plasmid pDL besitzt eine Größe von 5690 bp (Abb. 5.1).

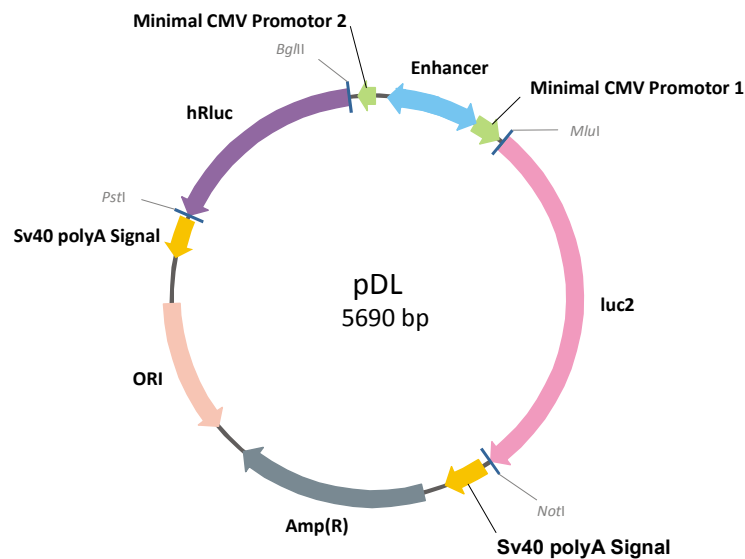


Abbildung 5.1 Plasmidkarte von pDL

Eingezeichnet ist das gemeinsame *Enhancer* Element (blau) sowie beide CMV Promotoren (grün). Dahinter befindet sich die Firefly-Luziferase *luc2* bzw. die Renilla-Luziferase *hRluc*. Die Transkription wird durch ein SV40 PolyA Signal (gelb) terminiert. Replikationsursprung für *E. coli* (ORI) und Ampicillin-Resistenz (Amp^R, β -Lactamase).

5.6.2 pDLP

Ausgehend von pDL wurde eine Destabilisierungssequenz hinter das *luc2* Gen kloniert, um eine Firefly-Luziferase mit verkürzter Halbwertszeit zu generieren. Dafür wurde die aa-Sequenz der MODC (*mouse ornithine decarboxylase*) mit folgenden Änderungen verwendet: MODC aa 421-461 mit D433A und D434A. Die Sequenz wurde von pFL/PEST amplifiziert und in einer Zwei-Schritt-PCR an die Sequenz von *luc2* gehängt. Das PCR-Fragment wurde über die Schnittstellen *MluI* und *NotI* in pDL kloniert.

5.6.3 FLAG-MAX-Fusionen

pFLAG-WT, pFLAG-E, pFLAG-full, pFLAG-WT+e2, pFLAG-E+e2, pFLAG-full+e2

Um die verschiedenen MAX Isoformen mit N-terminalem FLAG-Tag (DYKDDDDK) exprimieren zu können, wurden deren CDS in pFLAG-CMV-6a eingebracht. Die CDS des MAX Wildtyps (WT; Ensembl Transcript ID: ENST00000358664) und der Isoform E (Ensembl Transcript ID: ENST00000284165) wurden mit und ohne die Sequenz für das alternative Exon 2 (aa 13-21) kloniert. Zusätzlich wurde ein Full-Konstrukt generiert, welches für alle Exons 1, (2), 3, 4 und 5 kodiert sowie die Sequenz von Intron 4 enthält und somit alle Isoformen exprimieren kann. Die MAX CDS wurde von cDNA bzw. gDNA amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *ClaI* hinter die Sequenz des FLAG-Tags kloniert.

pFLAG-WT98, pFLAG-WT103, pFLAG-WT134, pFLAG-WT148

Nach oben genanntem Schema wurden weitere Verkürzungen des MAX-WT am C-Terminus vorgenommen, der Name des Plasmids gibt die letzte enthaltene aa an. Die einzelnen Fragmente wurden von pFLAG-WT amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *ClaI* in pFLAG-CMV-6a kloniert.

pFLAG-WT148-NLS, pFLAG-E-NLS

Hinter die beiden Konstrukte pFLAG-WT und pFLAG-E wurde eine C-terminale SV40 NLS (PKKKRKVEDP) kloniert. Die Sequenz wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden an die CDS von WT und E angefügt, bei der PCR wurden die Ausgangsplasmide als Templat verwendet. Die Fragmente wurden mit den Schnittstellen *HindIII* und *Clal* in pFLAG-CMV-6a kloniert.

5.6.4 HA-MAX-Fusionen

pCMV-3xHA-WT, pCMV-3xHA-E

Die CDS von MAX Wildtyp und MAX Isoform E sollte als Fusionsprotein mit einem 3fachen, N-terminalen HA-Tag (YPYDVPDYA) exprimiert werden. Dafür wurde die Sequenz des HA-Tags in einer 2stufigen PCR mit pFLAG-WT und pFLAG-E als Templat angefügt, ebenso wie die Schnittstellen *XhoI* und *XbaI*. Das Fragment wurde in das Plasmid pCMV-MS kloniert, welches eine MCS aufweist, die zwischen einem CMV Promotor und einem SV40 PolyA Signal liegt.

5.6.5 GFP-MAX-Fusionen

pEGFP, pEGFP-WT, pEGFP-E

Alle GFP-MAX-Konstrukte wurden unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *AgeI* und *XbaI* in das Plasmid pCMV-MS kloniert. Die Sequenz von eGFP wurde von dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) unter Anfügen der Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme amplifiziert. Die Konstrukte der MAX-Fusionsproteine pEGFP-WT und pEGFP-E enthalten ein N-terminales GFP. Die beiden Proteine werden von einem Serin-Glycin (SG4)-Linker (SGGGG) getrennt. Die N-terminale GFP-Sequenz wurde von pEGFP amplifiziert, die C-terminale, MAX spezifische Sequenz wurde von den pFLAG-Konstrukten (pFLAG-WT/E, Kapitel 5.6.3) amplifiziert. Durch Anfügen der SG4-Sequenz an die beiden Fragmente konnten diese durch die Überlappung in einer dritten PCR als Gesamtfragment amplifiziert werden.

pEGFP/P, pEGFP/P-WT135-148, pEGFP/P-WT135-160, pEGFP/P-WT149-160, pEGFP/P-E99-134

pEGFP/P enthält eine destabilisierte Variante des eGFP Gens mit sogenannter PEST-Sequenz. Dazu wurde die aa-Sequenz der Maus Ornithin Decarboxylase (aa 422-461) mit folgenden Änderungen an den C-Terminus von eGFP gesetzt: Glu 428, 430, 431 zu Ala¹²⁹. Die Sequenz für eGFP/P wurde über *AgeI* und *XbaI* in den Vektor pCMV-MS ligiert. Zur Herstellung der Plasmide pEGFP/P-WT135-160, pEGFP/P-WT135-148 und pEGFP/P-E99-134 wurde eine Multi-Step-PCR verwendet, bei der die MAX Sequenzen an den C-Terminus von eGFP/P fusioniert wurden. Es wurden zwei Fragmente mit einem Überhang amplifiziert, sodass in einer dritten PCR beide Fragmente verbunden werden konnten. Dazu wurden die 5' Fragmente von pEGFP/P und die 3' Fragmente von pFLAG-WT oder pFLAG-E amplifiziert. Die Sequenz für das Plasmid pEGFP/P-WT149-160 wurde in einer PCR mit pEGFP/P als Templat und Anfügen der WT-Sequenz (aa 149-160) am 3' Ende durch ein Oligonukleotid mit passendem Überhang bereitgestellt. Alle Konstrukte wurden mit den Schnittstellen *AgeI* und *XbaI* in das Plasmid pCMV-MS kloniert.

5.6.6 Luziferase-MAX-Fusionen

pDL-WT135-148, pDL-WT-135-160, pDL-WT149-160, pDL-E99-134

Die angegebenen aa des MAX Wildtyps oder Isoform E wurden C-terminal an das *luc2* Gen fusioniert, sodass ein Fusionsprotein aus Luziferase und MAX spezifischen aa entsteht. Alle Konstrukte wurden mit den Schnittstellen *MluI* und *NotI* in das Ausgangsplasmid pDL kloniert. Eine PCR amplifizierte das *luc2* Gen von pDL mit einem Überhang zu den zu klonierenden MAX Sequenzen, während in einer zweiten PCR die MAX-Sequenzen von pFLAG-WT/E mit Überhang zum *luc2* Gen amplifiziert wurden. Beide Fragmente wurden in einer dritten PCR zusammengeführt. Die Sequenz des MAX Wildtyps (aa 149-160) wurde in einer PCR mit pDL als Templat durch ein rückwärts Oligonukleotid direkt angefügt.

pDL-E99-117, pDL-E99-117mut, pDL-E99-134mut

Ausgehend von pDL-E99-134 wurde eine Verkürzung der MAX-E spezifischen aa von 99-134 auf 99-117 an das *luc2* Gen angefügt (pDL-E99-117). Außerdem wurde eine Mutante kloniert, die folgende Mutationen aufweist: Trp 105 Ala; Gly 106 Ala; Pro 109 Ala; Cys 110 Ala. Die Mutante wurde sowohl in pDL-E99-134 eingefügt (pDL-E99-134mut), als auch in die verkürzte Variante (pDL-E99-117mut). Alle Fragmente wurden von pDL-E99-134 amplifiziert, dabei wurden die Mutationen durch Oligonukleotide in einer Mehr-Schritt-PCR eingebracht. Die Konstrukte wurden mit den Schnittstellen *KasI* und *NotI* in das Plasmid pDL kloniert.

5.6.7 Template für *in vitro* Transkriptionen

pIVTL-FLAG-WT und pIVTL-FLAG-E

Zur *in vitro* Transkription wird die CDS von FLAG-MAX-WT/E in den Vektor pMR kloniert, der einen T7 Promotor und eine PolyA-Stelle enthält. Die Fragmente wurden abwärts des T7 Promotors in die Schnittstellen *NcoI* und *XbaI* eingebracht. Die Amplifikation erfolgte mit pFLAG-WT/E als Templat. Die Plasmide wurden vor der Transkription mit *Agel* abwärts des PolyA-Signals linearisiert.

pHDV-hnRNP DL-Exon8

Zur *in vitro* Transkription wurde die Sequenz von *hnRNP DL* Exon 8 in das Plasmid pHDV-N1-delta678 kloniert. Dafür wurde die Sequenz des Exons von pDL-hnRNPD amplifiziert und zusätzlich der T7 Promotor über das vorwärts Oligonukleotid angefügt. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in pHDV-N1-delta678 kloniert. Das Plasmid wurde vor der Transkription mit *HindIII* linearisiert.

5.6.8 hnRNP DL Minigene

pcAT7-DL 1-7

Zur Analyse des Spleißverhaltens wurden verschieden lange Bereiche des *hnRNP DL* Exons 8 und der umliegenden intronischen Sequenzen in das Plasmid pcAT7-CDMS2A eingebracht. Somit liegt das alternative *hnRNP DL* Exon 8 zwischen zwei konstitutiv exprimierten Exons des *PTPRC* Gens und die Regulation kann somit isoliert betrachtet werden. Die Klonierung der Konstrukte pcAT7-DL1-6 (im Folgenden nur DL 1-6 genannt) erfolgte über die

Amplifikation der Bereiche mit pDL-hnRNPD_L als Templat und fügte die Schnittstellen *Bsr*GI und *Bgl*II an das Fragment an. Tabelle 5.13 gibt den Bereich an, der zusätzlich zu Exon 8 in pcAT7-CDMS2A eingebracht wurde. Für das Konstrukt pcAT7-DL7 (im Folgenden nur DL 7) wurde zunächst Exon 8 von *hnRNP DL* mit überhängenden Enden zu den *PTPRC* Introns amplifiziert, in zwei weiteren PCR Ansätzen wurden die 5' und 3' liegenden intronischen Bereiche von *PTPRC* zwischen Schnittstelle und zu klonierendem Exon 8 amplifiziert. In einer dritten PCR wurden die Fragmente zusammengeführt und mit den Schnittstellen *Bsr*GI und *Bgl*II in pcAT7-CDMS2A kloniert.

Tabelle 5.13 Übersicht der klonierten Fragmente von hnRNP DL in pcAT7-CDMS2

Konstrukt	Anzahl der nt von Intron 7	Exon 8 [105 nt]	Anzahl der nt von Intron 8
DL 1	200	Ja	600
DL 2	50	Ja	600
DL 3	200	Ja	50
DL 4	50	Ja	50
DL 5	150	Ja	50
DL 6	100	Ja	50
DL 7	0	Ja	0

pDL-hnRNPD_L-Δ100-50

Zur Analyse der hnRNP DL Bindestelle wurden ausgehend von dem pDL-hnRNPD_L Plasmid 50 nt deletiert, die als Bindestelle überprüft werden sollten. Bei den deletierten Nukleotiden handelt es sich in Intron 7 um die 100-50 nt aufwärts der 3' SS liegende Sequenz. Die Amplifikation erfolgte mit zwei Oligonukleotidpaaren, die ausgehend von pDL-hnRNPD_L den 5' Bereich vor der Deletion und den 3' Bereich hinter der Deletion mit einem gemeinsamen Überhang amplifizierten. In einer dritten PCR konnten beide Fragmente zusammengeführt werden und anschließend mit den Schnittstellen *Not*I und *Sal*I in das Plasmid pDL kloniert werden.

5.6.9 hnRNP DL Überexpressionsplasmide pCMV-hnRNPD_L und pCMV-hnRNPD_LΔ6

Um hnRNP DL gezielt überexprimieren zu können, wurde die CDS der verschiedenen Isoformen in das Plasmid pCMV-MS eingebracht, in dem die Proteine unter Kontrolle des viralen CMV Promotors exprimiert werden. Zwei Isoformen mit unterschiedlichem Transkriptionsstart führen zu einem 420 aa langen Protein (hnRNP DL_{lang}, Ensembl Transcript ID: ENST00000621267) und einem 301 aa langen Protein (hnRNP DL, Ensembl Transcript ID: ENST00000507721), welches einen verkürzten N-Terminus aufweist, sonst aber mit hnRNP DL_{lang} identisch ist⁶⁷. Die CDS von hnRNP DL wurde von dem Plasmid pCMV-hnRNPD_L_{lang}⁸⁵ amplifiziert und mit den Schnittstellen *Age*I und *Xba*I in pCMV-MS ligiert.

Eine weitere Isoform ist hnRNP DLΔ6, ausgehend von dem 301 aa langen Polypeptid hnRNP DL, bei dem Exon 6 (kodiert für 57 aa) nicht exprimiert wird⁶⁸. Die Amplifikation erfolgte mit zwei Oligonukleotidpaaren, die ausgehend von pCMV-hnRNPD_L den 5' Bereich (Exon 1-5) und den 3' Bereich (Exon 7) mit einem gemeinsamen Überhang amplifizierten. In einer dritten PCR konnten beide Fragmente zusammengeführt werden und anschließend mit den Schnittstellen *Age*I und *Xba*I in das Plasmid pCMV-MS kloniert werden.

5.6.10 Stabile Integration pFRT-GFP-hnRNPD

Die Sequenz von hnRNP DL wurde mit N-terminalem GFP kloniert. Die Sequenzen von hnRNP DL wurden ausgehend von pCMV-hnRNPD amplifiziert, die GFP-Sequenz wurde von pCMV-EGFP amplifiziert, beide Proteine wurden als Fusionsproteine exprimiert und enthalten einen Serin-Glycin-Linker (SGGGG), der beide Polypeptide voneinander trennt, um deren Faltung und Funktion nicht zu beeinträchtigen. Die amplifizierten Fragmente enthalten einen passenden Überhang und wurden in einer dritten PCR zusammengeführt. Die Fragmente wurden mit den Schnittstellen *BsiWI* und *SacI* in das Plasmid pFRT-CD20 kloniert. Dieses exprimiert die Proteine unter Kontrolle eines CMV Promotors und enthält eine Hygromycin-Resistenz (ohne Startcodon) zur Selektion der transfizierten Zellen mit integriertem Plasmid (Expression der Hygromycin-Resistenz).

5.6.11 hnRNP D

HnRNP D Überexpressionsplasmide pCMV-hnRNPD45/D42/D40/D37

Um hnRNP D Proteine zu überexprimieren, wurden die CDS der verschiedenen Isoformen hnRNP D45, D42, D40 und D37 in das Plasmid pCMV-MS kloniert. Die Protein Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein der alternativen Exons 2 und 7. D45 enthält beide alternativen Exons, während der kürzesten Isoform D37 beide Exons fehlen. D42 enthält kein Exon 2, während D40 kein Exon 7 exprimiert¹¹³. Die Sequenz der Isoformen wurde in mehreren Schritten amplifiziert. Das erste Oligonukleotidpaar amplifizierte den Bereich von Exon 1 bis Exon 3/4 mit cDNA als Templat, sodass zwei Fragmente, mit und ohne Exon 2, erhalten wurden. Ein weiteres Oligonukleotidpaar amplifizierte den Bereich von Exon 3/4 bis Exon 8, sodass die Fragmente mit und ohne Exon 7 amplifiziert wurden. Jeweils ein Fragment von Exon 1-3/4 wurde mit einem Fragment von Exon 3/4-8 kombiniert, sodass die Sequenz der vier Isoformen erhalten wurde. Alle Fragmente wurden mit *XhoI* und *AgeI* kloniert.

HnRNP D: Minigen pDL-hnRNPD

Der 3' UTR von *hnRNP D* wurde hinter den ORF des *luc2* Gens in pDL kloniert, sodass Änderungen des Spleißens von *hnRNP D* Exon 9 analysiert werden konnten. Dafür wurde der gesamte 3' UTR ausgehend von pDLP-hnRNPD amplifiziert und mit den Schnittstellen *NotI* und *SalI* in den Vektor pDL kloniert.

5.7 Methoden

5.7.1 Methoden zur Behandlung prokaryotischer Zellen

5.7.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB Flüssig- oder Festmedium bei 37°C für ca. 16 h. Gegebenenfalls wurde dem Medium das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. Flüssigkulturen wurden in Schräglage bei 150-180 rpm schüttelnd inkubiert. Die kurzzeitige Lagerung von Festkulturen erfolgte bei 4°C.

5.7.1.2 Herstellung CaCl_2 kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde ein frischer Ausstrich des Zellstocks auf LB Festmedium angefertigt. Hiervon wurde eine 4 ml ÜNK inokuliert, woraus anschließend 200 ml LB-Medium in einem 1 l Kolben angeimpft und bei 37°C / 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,5 angezogen wurden. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und auf 4 Reaktionsgefäße (je 50 ml) aufgeteilt. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm pelletiert, der Überstand wurde dekantiert. Das Waschen der Pellets erfolgte durch Resuspendieren der Zellen in je 25 ml 0,1 M CaCl_2 und erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 6000 rpm. Die Pellets wurden in insgesamt 20 ml 0,1 M CaCl_2 aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 100% Glycerin (Endkonzentration 15%) wurden die Zellen zu je 330 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Kompetenz der *E. coli* Zellen wurde nach Hanahan *et al.* unter Verwendung des pUC19 Plasmids durchgeführt¹⁶⁴. CFU-Werte (*Colony Forming Unit*) im Bereich von 10^6 oder darüber waren akzeptabel.

5.7.1.3 Transformation CaCl_2 kompetenter *E. coli* Zellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl Zellen zusammen mit der zu transformierenden DNA (20 µl Ligationsansatz; 1-100 ng Plasmid-DNA) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min bei 13000 rpm) pelletiert, der Überstand dekantiert. Die Bakterien wurden im Rückfluss resuspendiert und der gesamte Ansatz auf Selektivmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Bei Retransformationen konnten, aufgrund der leichteren Transformierbarkeit, die Schritte verkürzt werden, sodass nur 10 min Inkubation auf Eis, 15 sec Hitzeschock und 30 min bei 37°C benötigt wurden. Ausplattiert wurden hier nur 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektivmedium.

5.7.2 Methoden zur Behandlung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfolgten unter der Sterilbank. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Alle Kulturen wurden regelmäßig auf Mycoplasmen getestet.

5.7.2.1 Arbeiten mit HUVEC

Kultivierung

HUVEC sind Primärzellen und können nur ca. 12x passagiert werden. Für die durchgeführten Experimente wurden HUVEC der Passagen 2 und 3 verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in T75 Flaschen mit 10 ml EBM mit 10% FCS und EGM *single quots* (hEGF, Hydrocortison, GA-1000, BBE) kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 2 ml TE-Puffer bei RT inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop beobachtet, sodass der TE-Puffer kurz vor dem Ablösen der Zellen wieder entfernt werden konnte. Die Zellen wurden noch 1-2 min bei RT inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche gelöst hatten. Dann wurden 6 ml Medium dazugegeben und die Zellen 1:6 passagiert. Für eine anschließende Elektroporation wurden die Zellen 1:2 passagiert, damit nach 2 Tagen eine ausreichende Konfluenz von ca. 60-70% vorlag.

Hypoxie-Stress

Zur Untersuchung von Hypoxie-Stress wurden je $1,5 \cdot 10^6$ Zellen in einer 60 mm Schale in 4 ml Medium ausgebracht, nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen anschließend für 48 h bei Normoxie (21%) bzw. Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Die Zellen sollten zu Beginn der 48stündigen Inkubation 100% konfluent sein. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator, der Sauerstoff durch Stickstoff ersetzen kann.

Cycloheximid-Behandlung

Zur Behandlung der HUVEC mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 60 mm Schale ausgebracht und wie beschrieben für 48 h bei Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Anschließend wurde CHX zu einer finalen Konzentration von 5 bzw. 10 µM zugegeben und für weitere 8 h inkubiert.

Elektroporation

HUVECs wurden in T75 Kulturflaschen zu einer Konfluenz von 60-70% über 2 Tage angezogen. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA gelöst und die Reaktion durch Zugabe von Trypsin Neutralization Solution gestoppt. Je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert und in 100 µl P5 Primary Cell Solution aufgenommen.

Folgende Plasmidmengen wurden zur Elektroporation eingesetzt:

- 2 µg pFLAG-Konstrukte
- 5 µg pEGFP-Konstrukte
- 0,5 µg pCMV-MAX-A/B

Die DNA wurde zu den Zellen hinzugegeben, anschließend wurde der Ansatz in einem 4D-Nucleofector (Zelltypprogramm CA-167, HUVEC) elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden zunächst in ein 6-*well* mit 1,7 ml vorgelegtem Medium (für 1-2 h bei 37°C, 5% CO₂ vorgewärmt) überführt und anschließend auf zwei 12-*wells* aufgeteilt (je 800 µl). So wurde die identische Behandlung zweier Proben gewährleistet. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und erneut frisches Medium zugefügt. Dann wurden die Zellen für 48 h bei Normoxie oder Hypoxie (1% O₂) inkubiert.

Transfektion mit RNAiMAX

Zur Transfektion von HUVEC mit siRNA wurde das Reagenz RNAiMAX verwendet. Die Zellen wurden in 60 mm Schalen zu je $1,5 \cdot 10^6$ Zellen (UPF1 *knockdown*) bzw. $3,5 \cdot 10^5$ Zellen (hnRNP DL *knockdown*) ausgesät und nach 18-24 h transfiziert.

Im ersten Ansatz wurden 250 µl Opti-MEM mit der gewünschten Menge siRNA versetzt (15 pmol UPF1, 60 pmol hnRNP DL). Der zweite Ansatz enthielt 250 µl Opti-MEM und 5 µl RNAiMAX. Beide Ansätze wurden vereint und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml Opti-MEM gewaschen, dann wurden 2500 µl Opti-MEM zugegeben und 500 µl Transfektionsreagenz langsam auf der Platte verteilt. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 4 ml Medium. Für UPF1 wurde nach 48 h die RNA bzw. das Protein isoliert, für hnRNP DL wurden die Zellen nach 48 h oder 72 h analysiert.

Kristallviolett-Assay

Der Kristallviolett-Assay bestimmt die Viabilität von Zellen. Dazu wurden die Zellen 48 h und 72 h nach siRNA vermitteltem *knockdown* von hnRNP DL mit 500 µl 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 250 µl Trypsin-EDTA gelöst. Die Zellen wurden mit 250 µl Medium versetzt und die Lebendzellzahl durch manuelles Auszählen nach Trypanblaufärbung bestimmt. Je $1 \cdot 10^5$ Zellen in 200 µl Medium wurden in 4fach Bestimmung in 96-*well*-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen für 5 min mit 200 µl 0,5% Formaldehyd (in PBS) fixiert. Die Zellen wurden mit 200 µl 1x PBS gewaschen und dann mit 50 µl Kristallviolettlösung (0,5%) für 10 min bei RT angefärbt. Anschließend wurde 3mal mit je 200 µl 1x PBS gewaschen, dann wurden 100 µl 33%ige Essigsäure zugegeben, für 5 min bei RT inkubiert, gemischt und die Absorption bei 620 nm (5 Blitze) am Spektrophotometer Infinite® M200 PRO gemessen.

5.7.2.2 Arbeiten mit HeLa-Zellen

Kultivierung

Die Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in 20 ml DMEM mit 10% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in T75 Gewebekulturflaschen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die zu 80-90% konfluenten Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend durch 1-5minütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml TE-Puffer abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit 20 µl der Zellsuspension mit Hilfe des TC10 Zellzählers. T75 Flaschen wurden mit $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät. Für Transfektionen mit Lipofectamine wurden HeLa-Zellen zu einer Dichte von 125.000 Zellen pro 12-*well* ausgesät, für Transfektionen mit RNAiMAX wurden 60.000 Zellen pro 12-*well* ausgesät. Bei Verwendung von Platten anderer Größe wurde die Zellzahl sowie das Medium entsprechend der Fläche angepasst, also 0,5fach für 24-*well*- oder 2,5fach für 6-*well*-Platten.

Transfektion mit Lipofectamine 2000

HeLa-Zellen wurden so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 80-90% konfluent waren, dies entspricht 125.000 Zellen für 12-*well*-Platten, 24 h vor der Transfektion.

Für die Lipofektion wurden 375-1500 ng Plasmid (Tabelle 5.14) pro 12-*well* eingesetzt und jeweils in 100 µl Opti-MEM verdünnt. In einem weiteren Ansatz wurden 2 µl Lipofectamine 2000 mit 100 µl Opti-MEM versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vereinen beider Ansätze folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit je 2 ml 1x PBS gewaschen, anschließend wurde je 1 ml Opti-MEM vorgelegt. Je 200 µl Transfektionsmix wurde pro *well* zugefügt und die Zellen für 2 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde durch 2 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen nach 24 h weiterverarbeitet.

Alle Angaben wurden entsprechend erhöht oder verringert, abhängig von der Wachstumsfläche der Zellen.

Tabelle 5.14 Transfizierte Plasmidmengen in HeLa-Zellen

Konstrukt	Transfizierte Menge pro 12- <i>well</i> [ng]
pFLAG-WT/E/FULL	375 (WT) – 1500 (E und weitere WT/E-Varianten)
pEGFP-Varianten	500 (CHX), 1500
pCMV-HA-WT/E	1500
Transfizierte Menge pro 24- <i>well</i> [ng]	
pDL-Varianten	100

Transfektion mit Lipofectamine 3000

Die Lipofektion mit Lipofectamine 3000 erfolgte im Wesentlichen wie für Lipofectamine 2000 und richtete sich nach den Herstellerangaben. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, dabei wurden 62.500 Zellen für ein 24-*well* und 125.000 Zellen für ein 12-*well* verwendet, sodass die Zellen am Tag der Transfektion 80-90% konfluent waren.

Für die Transfektion eines 12-*well*s wurden 800 ng Plasmid (200 ng pcAT7 mit 600 ng pCMV) in 50 µl Opti-MEM gelöst. Zusätzlich wurden 2 µl P3000 Reagenz hinzugefügt. In einem zweiten Ansatz wurden 2 µl Lipofectamine 3000 in 50 µl Opti-MEM gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Beide Ansätze wurden gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml 1x PBS gewaschen und je 1 ml Opti-MEM zugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Transfektionsreagenz versetzt und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 h wurde das Transfektionsgemisch durch 2 ml frisches Medium ersetzt.

Für Kotransfektionen von Plasmiden mit siRNA wurde kein P3000 Reagenz verwendet, dabei wurden 6 pmol siRNA (hnRNP DL) eingesetzt. Alle Angaben wurden entsprechend erhöht oder verringert, abhängig von der Wachstumsfläche der Zellen.

Transfektion mit RNAiMAX

Es wurden 60.000 Zellen pro 12-*well* ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% aufwiesen.

4 pmol siRNA (UPF1) wurden mit 100 µl Opti-MEM versetzt, in einem zweiten Ansatz wurden 1,6 µl RNAiMAX mit 100 µl Opti-MEM versetzt. Nach Mischen beider Ansätze wurde der Transfektionsmix für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit Opti-MEM gewaschen und 1000 µl Opti-MEM vorgelegt. 200 µl Transfektionsmix wurde zugegeben und die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 4 h wurde das Transfektionsgemisch durch 2 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen nach 48 h verarbeitet.

Cycloheximid-Behandlung

HeLa-Zellen wurden in einer 12-*well*-Platte zu je 125.000 Zellen/*well* ausgesät. Nach 24 h wurde bei den HeLa-Zellen das Medium gewechselt, nach weiteren 2 h wurde CHX in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und die RNA nach 3 bzw. 6 h isoliert. Als Kontrolle wurde die RNA von unbehandelten Zellen isoliert.

Dual-Luciferase Assay

Transfektionen für eine spätere Messung der Luziferase-Aktivität wurden im 24-*well*-Format transfiziert und nach Abschluss der Transfektion wurde DMEM ohne Phenolrot verwendet. Die Luziferase-Aktivität wurde 24 h nach der Transfektion gemessen. Das Medium wurde entfernt und 100 µl frisches Medium (ohne Phenolrot) zugegeben. Anschließend wurden 100 µl Dual-Glo® Luciferase Reagenz zugegeben. Dieses enthält neben dem Firefly-Substrat auch zellaufschließende Substanzen, sodass nach dem Zellaufschluss die im Überstand befindlichen Firefly-Luziferasen mit ihrem Substrat reagieren konnten. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung luftblasenfrei in eine weiße 96-*well*-Platte überführt. Die Bestimmung der Lichtintensität erfolgte am Spektrophotometer Infinite® M200 PRO (Voreinstellung: Lumineszenz, keine Abschwächung, 1000 ms Integrationszeit). Zur Messung der Aktivität der Renilla-Luziferase wurden 100 µl des Dual-Glo® Stop&Glo® Reagenz zugegeben, 5 min bei RT inkubiert und erneut die Lichtintensität ausgelesen. Durch Bildung eines Quotienten aus Firefly- und Renilla-Luziferase konnten die relativen Lichteinheiten bestimmt werden.

Fluoreszenz-Mikroskopie

Um GFP-Fusionsproteine zu lokalisieren wurden $2 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen in eine 6-*well*-Platte mit Deckglas ausgesät. Die Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 transfiziert (Kapitel 5.7.2.2) und nach 24 h fixiert und gefärbt. Dazu wurden die Zellen zunächst 3mal mit je 3 ml 1x PBS gewaschen und dann mit 3 ml 3%igem Formaldehyd (in PBS) für 10 min fixiert. Nach erneutem, 3maligem Waschen wurden die Nuklei mit 3 ml Höchst (1 µg/ml) für 5 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 5mal mit 1x PBS gewaschen und dann das Deckglas mit Moviol auf einem Objektträger über Nacht fixiert. Die Fluoreszenzbilder wurden an einem Axiovert 200 mit 40facher Vergrößerung und Filter für DAPI bzw. GFP aufgenommen.

5.7.2.3 Arbeiten mit HF1-3-Zellen

Flp-In™ System

Um eine Zelllinie zu generieren, die das Fusionsprotein GFP-hnRNP DL bzw. GFP als Kontrolle konstitutiv exprimiert, wurde das Flp-In System von Thermo Fisher verwendet¹⁶⁵. Als Wirts-Zelllinie wurden HF1-3-Zellen verwendet. Diese wurden generiert, wie für die Zelllinie HF1-1 beschrieben [Berens 2006]. Beide Zelllinien sind unabhängige Schwester-Zelllinien, die aus derselben Selektion entstanden sind. Sie wurden ausgehend von HeLa-Zellen generiert und enthalten die notwendige FRT Stelle für die stabile Integration mit dem Flp-In System.

Bei einer Kotransfektion werden das Rekombinase exprimierende pOG44 sowie das Zielgen exprimierende pFRT Plasmid in die Wirts-Zelllinie transfiziert. Durch die Flp Rekombinase wird eine homologe Rekombination zwischen den FRT Stellen im Genom und auf dem pFRT-Plasmid ausgelöst, sodass das pFRT-Plasmid in das Genom integriert wird. Dadurch erhält das Hygromycin-Resistenzgen ein ATG Startcodon, gleichzeitig wird das Zeocingen inaktiviert. Somit können Flp-In Expressions-Zelllinien mit Hygromycin selektiert werden.

Kultivierung

HF1-3-Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in 20 ml DMEM mit 10% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Zeocin in T75 Gewebekulturflaschen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die zu 80-90% konfluenten Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend durch 1-5minütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml TE-Puffer abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit 20 µl der Zellsuspension mit Hilfe des TC10 Zellzählers. T75 Flaschen wurden mit 3*10⁵ Zellen ausgesät.

Generierung einer stabilen Zelllinie

HF1-3-Zellen wurden in ein 6-*well* zu 125.000 Zellen in DMEM ohne Zeocin ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit 250 ng pFRT-GFP-hnRNPD L bzw. pFRT-GFP als Kontrolle und jeweils 2,25 µg pOG44 (Verhältnis 1:9) mit Lipofectamine 2000. Die Transfektion wurde, wie für HeLa-Zellen beschrieben, mit der 2,5fachen Menge des 12-*well*-Ansatzes durchgeführt. Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde durch 5 ml frisches Medium ohne Selektionsdruck ersetzt.

Nach 48 h wurden die Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,5 ml TE-Puffer gelöst. Die Zellen wurden in eine T25 Gewebekulturflasche mit 10 ml DMEM (mit 10% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin) ohne Selektionsdruck überführt. Nach ca. 8 h wurde das Medium ausgetauscht und zusätzlich 150 µg/ml Hygromycin B zugefügt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen wie beschrieben in T75 Gewebekulturflaschen (je 5*10⁵ Zellen) überführt, Hygromycin B (150 µg/ml) wurde dem Medium direkt zugegeben. Die Zellen wurden für ca. 2 Wochen unter Selektionsdruck kultiviert und dabei 3mal wöchentlich zu je 2,5*10⁵ – 5*10⁵ Zellen in neue T75 Gewebekulturflaschen überführt. Um den Selektionsdruck zu gewährleisten sollten die Zellen eine Konfluenz von ca. 40-50% nicht überschreiten.

Zur Isolierung von RNA- und Proteinproben wurden je 300.000 Zellen in ein 6-*well* ausgesät und die Zellen nach 24 h weiterverarbeitet. Die Expression des integrierten GFP-hnRNP DL-Fusionsproteins wurde anschließend im Western Blot überprüft.

5.7.3 Allgemeine Methoden mit Nukleinsäuren

5.7.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei 260 nm UV-spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer in ng/μl bestimmt. Als Referenz wurde Wasser verwendet. Zur Umrechnung in mol/L wurde der mittlere Extinktionskoeffizient von 660 g/mol pro Basenpaar DNA und 317 g/mol für einzelsträngige RNA verwendet.

5.7.3.2 Plasmidpräparation

Für kleinere Mengen Plasmid erfolgte die Plasmidpräparation mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits aus einer 4 ml *E. coli* ÜNK. Für größere Mengen wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit verwendet. Hierfür wurden Zellen aus 100 ml Kultur verwendet. Die Plasmidpräparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution von Minipräparationen erfolgte in 50 μl MQ. Bei Maxipräparationen erfolgte die Elution in 200-500 μl MQ.

5.7.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Desoxyribonukleinsäuren wurde von *Seqlab* durchgeführt und basierte auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger. Für die Sequenzierung wurden je 1200 ng Plasmid mit 30 pmol eines Oligonukleotids in einem Volumen von 15 μl an *Seqlab* versandt.

5.7.3.4 Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente dem Nachweis der Reinheit und Integrität von Nukleinsäuren sowie der Auftrennung nach ihrer Länge. Abhängig von der Länge der nachzuweisenden DNA wurden Agarosekonzentrationen von 1-3% (w/v) in 1x TAE eingesetzt. Als Größenstandard wurde für 1%ige Gele die peqGold 1 kb DNA-Leiter, für 3%ige Gele die peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II verwendet. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und durch Anlegen eines elektrischen Felds (8-10 V/cm Gellänge) aufgetrennt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese im Ethidiumbromid-Bad (100 μg/ml) angefärbt und mit der Videodokumentationsanlage von INTAS unter Bestrahlung durch UV-Licht (254 nm) fotografiert.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde für die Analyse von RNA verwendet, da sie eine feinere Auftrennung von Nukleinsäuren ermöglicht. Je nach Größe der aufzutrennenden RNA wurde eine Prozentigkeit von 6-15% Acrylamid (v/v) und 8 M Harnstoff zur Denaturierung gewählt, die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,01 Vol APS (10%) und 0,001 Vol TEMED katalysiert. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die Proben sowie der Größenstandard Low Range ssRNA Ladder wurden vor dem Gellauf mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei 15-30 V/cm Gellänge, die Gele wurden in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

5.7.3.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Gelen

Präparative Agarosegele zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm behandelt um UV vermittelte Schäden zu vermeiden. Die DNA wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA in MQ eluiert.

Zur Aufreinigung von RNA-Molekülen aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen wurden diese unter UV-Bestrahlung mit einer Handlampe ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Über Nacht wurden die Gelstücke in 0,3 M NaAc bei 4°C eluiert und dann mittels ethanolischer Fällung aufgereinigt.

5.7.3.6 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit standardmäßig mit Hilfe der ethanolischen Fällung mit Natriumacetat (NaAc) gefällt. Eine Ausnahme stellt die Fällung mit Lithiumchlorid dar, die nach dem Biotinylieren von RNA durchgeführt wurde.

Ethanolpräzipitation mit Natriumacetat

Bei der Ethanolfällung wurde die Nukleinsäure mit 0,1 Vol 3 M NaAc pH 6,5 und 5 Vol 100% EtOH (4°C) versetzt und für 30 min bei -80°C oder alternativ 1 h bis mehrere Tage bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für mindestens 30 min bei 13000 rpm (4°C) wurde das Pellet mit 1 Vol 70% EtOH gewaschen (15 min bei 13000 rpm, 4°C), danach für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in MQ gelöst.

Lithiumchloridfällung

Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,125 Vol 4 M LiCl und 3,75 Vol 100% EtOH versetzt und für 1 h bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm (4°C) für 10 min wurde das Pellet mit 1 Vol 70% EtOH gewaschen (5 min bei 13000 rpm, 4°C), anschließend das Pellet für 5 min bei RT getrocknet und in MQ gelöst.

5.7.3.7 Phenolisierung von Nukleinsäuren

Die für RNA-Synthesen eingesetzten Plasmide wurden phenolisiert, um störende Proteine abzutrennen. Hierzu wurde die Nukleinsäure mit 1 Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, die Phasen vermischt und in ein vorbereitetes Maxtract-Gefäß überführt. Durch Zentrifugation nach Herstellerangaben wurden die Phasen getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Maxtract-Gefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, beide Phasen vermischt und erneut zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mittels Ethanol und NaAc gefällt.

5.7.3.8 Restriktionsendonukleolytische Spaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung mit Endonukleasen wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem zu den empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die verwendete Enzymmenge (Units) wurde mit Formel I berechnet, dabei war zu beachten, dass die Gesamtmenge des Enzyms 10% (v/v) des Gesamtvolumens nicht übersteigt. Die Definition der Units sowie die Referenz-DNA werden hierbei vom Hersteller der Restriktionsendonukleasen angegeben.

Formel I:
$$\text{benötigte Units} = \text{DNA-Menge } (\mu\text{g}) * \frac{\text{Länge (Referenz-DNA)} * \text{Anzahl der Schnittstellen (Probe)}}{\text{Länge (Probe)} * \text{Anzahl der Schnittstellen (Referenz-DNA)}}$$

5.7.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden passende freie DNA-Enden mittels enzymatischer Reaktion verbunden. Als Kofaktor benötigt die T4 DNA Ligase ATP, welches dem Reaktionsansatz in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben wurde. DNA-Fragment und Vektor (25 ng) wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte mit 400 U T4 DNA Ligase für 30 min bei Raumtemperatur, alternativ bei 16°C über Nacht.

5.7.3.10 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Zur Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Moleküle (<100 bp) wurden komplementäre Oligonukleotide (je 500 pmol) im Verhältnis 1:1 in MQ gemischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und dann langsam auf RT abgekühlt. Die Hybride konnten anschließend als Templat für *in vitro* Transkriptionen oder zur Ligation eingesetzt werden.

5.7.4 RNA-Präparation

5.7.4.1 RNA-Präparation mit miRNeasy Kit

Bei der RNA-Präparation aus HUVEC (35 oder 60 mm Schalen) und HF1-3-Zellen (6-well-Platten) wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit je 2 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und anschließend je 700 µl QIAzol Lysis Reagenz auf die Zellen gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Der optionale DNase-Verdau mit dem RNase freien DNase Set wurde durchgeführt, die Elution erfolgte in 35 µl MQ. Die Qualität der RNA-Präparation wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel kontrolliert.

5.7.4.2 RNA-Präparation mit Trizol

Die Präparation aus HeLa-Zellen sowie HUVEC (nach der Elektroporation) aus der 12-well-Platte erfolgte mit Trizol. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml 1x PBS-Puffer gewaschen, dann wurden 400 µl Trizol zugegeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 80 µl Chloroform wurden die Phasen durch 15 sec vortexen gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Die Phasen wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 13300 rpm und 4°C getrennt, dann wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden beide Phasen durch 15 sec vortexen gemischt und erneut 15 min bei 13300 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,75 µl GlycoBlue zur späteren Färbung des Pellets sowie 200 µl Isopropanol zur Fällung zugefügt. Die Fällung erfolgte für 10 min bei RT und die ausgefallene RNA wurde danach für mindestens 30 min bei 13300 rpm, 4°C sedimentiert. Die RNA wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen, das Pellet anschließend für 5 min bei RT getrocknet und in 33 µl MQ (HeLa) bzw. 35 µl MQ (HUVEC) aufgenommen. Der darauffolgende DNase-Verdau wurde für HeLa-RNA mit 3 µl Turbo-DNase für 30 min bei 37°C, für HUVEC-RNA mit 1 µl Turbo-DNase für 10 min bei RT durchgeführt. Die RNA wurde danach mit Ethanol und Natriumacetat gefällt und in 20 µl MQ aufgenommen. Die Qualität der RNA-Präparation wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel kontrolliert.

5.7.5 cDNA-Synthese

RNA wurde mit MuLV Reverser Transkriptase (MuLV) in cDNA umgeschrieben und diente als Ausgangsmaterial für PCR-Reaktionen. Je 1 µg RNA wurde auf 10 µl MQ aufgefüllt und 30 µl MasterMix (Tabelle 5.15) hinzugegeben. Nach Ablauf des Programms wurden die Proben mit MQ auf 200 µl aufgefüllt.

Tabelle 5.15 Ansatz für cDNA-Synthese mit MuLV Reverser Transkriptase

Reaktionsansatz			Programm	
12,6	µl	MQ	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
8	µl	MgCl ₂ , 25 mM	20°C	10 min
4	µl	10x Reaktionspuffer	42°C	15 min
0,4	µl	dNTPs, 100 mM	99°C	5 min
1	µl	RNase Inhibitor	4°C	∞
2	µl	Hexamere (0,4 µg)		
2	µl	MuLV		
30	µl	Summe		

5.7.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient zur gezielten Amplifizierung von DNA. Sie wurde zu analytischen Zwecken (Kolonie-PCRs und RT-PCR-Analysen) sowie für Klonierungsvorhaben (u.a. Einbringung von Restriktionsschnittstellen) eingesetzt. Für analytische PCRs wurde Taq-Polymerase verwendet, während eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, Q5 Polymerase) für Klonierungszwecke verwendet wurde.

5.7.6.1 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob die Zellen einer Bakterienkolonie ein Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment besitzen, wird eine Kolonie-PCR durchgeführt, bei der die Zellen als Templat dienen. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die außerhalb des einzubringenden DNA-Fragments liegen und somit konnte durch Größenabschätzung die Anwesenheit des einzubringenden Fragments überprüft werden. In Tabelle 5.16 ist der Reaktionsansatz für eine Kolonie-PCR-Reaktion angegeben. Die angegebene Elongationszeit ist variabel und richtet sich nach der Länge des erwarteten Fragments.

Tabelle 5.16 Reaktionsansatz und PCR-Programm für die Kolonie-PCR

PCR-Reaktionsansatz		PCR-Programm			
1x	ThermoPol-Puffer	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
7,5 pmol	Oligonukleotid vorwärts	Denaturierung	96°C	4 min	} 25x
7,5 pmol	Oligonukleotid rückwärts	Denaturierung	96°C	30 sec	
5 nmol	dNTPs	Annealing	50°C	30 sec	
1,25 U	Taq-Polymerase	Elongation	72°C	30 sec	
ad 25 µl	MQ	Elongation	72°C	7 min	
		Lagerung	8°C	∞	

5.7.6.2 PCR zu Klonierungszwecken

Für Klonierungszwecke wurde der gewünschte Bereich von gDNA oder Plasmiden amplifiziert. Durch eine gezielte Konstruktion der verwendeten Oligonukleotide wurde das Einführen von Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen ermöglicht. Die Polymerasen wurden in den Puffersystemen des Herstellers verwendet, für Reaktionen mit der Q5 Polymerase konnte bei Bedarf ein GC-Enhancer eingesetzt werden. Um die Spezifität der Polymerasekettenreaktion zu erhöhen und Sekundärstrukturen zu verringern, wurde außerdem bei Bedarf DMSO (Endkonzentration 3-9%) oder Trehalose (12%) anstelle von MQ eingesetzt. Einen typischen Reaktionsansatz für die Phusion Polymerase zeigt Tabelle 5.17.

Tabelle 5.17 PCR-Ansatz über gDNA oder Plasmide mit der Phusion Polymerase

Reaktionsansatz		PCR-Programm			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1x	HF/GC-Puffer	Denaturierung	98°C	3 min	} 35x
30 pmol	Oligonukleotid forwards	Denaturierung	98°C	15 sec	
30 pmol	Oligonukleotid rückwärts	Annealing	55°C	30 sec	
100 ng	Matrizen-DNA	Elongation	72°C	15-30 sec/kb	
20 nmol	dNTPs	Elongation	72°C	7 min	
2 U	Phusion-Polymerase	Lagerung	8°C	∞	
ad 100 µl	MQ				

5.7.6.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR verwendet cDNA als Matrize. Dadurch kann die Transkription eines Gens unter bestimmten Bedingungen oder das Vorkommen von Spleißvarianten untersucht werden.

In einem Ansatz werden je 25 µl Reaktionsansatz mit 5 µl der verdünnten cDNA (Kapitel 5.7.5) eingesetzt. Reaktionsansatz und PCR-Programm sind in Tabelle 5.18 aufgeführt.

Tabelle 5.18 Ansatz für RT-PCR

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
17,5 µl	MQ	95°C	5 min	} 25-35x
3 µl	10x ThermoPolPuffer	95°C	30 sec	
1,8 µl	Oligonukleotid vorwärts, 5 µM	55°C	30 sec	
1,8 µl	Oligonukleotid rückwärts, 5 µM	72°C	30 sec	
0,6 µl	dNTPs, je 10 mM	72°C	7 min	
0,3 µl	Taq	8°C	∞	
25 µl	Summe			

5.7.6.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Um RNA Spezies zu quantifizieren wurde die qPCR unter Verwendung von SYBR Green-Chemikalien verwendet. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 5 µl cDNA, 10 µl 2x FAST-SYBR-MIX und je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotid (10 µM). Es wurde ein StepOnePlus Real Time PCR Gerät eingesetzt und die Standard-Einstellungen für Fast-SYBR-Green Mixe inklusive Schmelztemperatur verwendet. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode¹⁶⁶. Alle Messungen erfolgten in technischen Duplikaten.

5.7.7 *In vitro* Translation

Die Herstellung der RNA für *in vitro* Translationen wurde mit phenolisierter und linearisierter DNA der pIVTL-Konstrukte unter folgenden Bedingungen durchgeführt: linearisierte DNA (20 ng/μl), 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 10 mM DTT, 0,16 U/μl RNasin (Promega), 0,5 mM NTP Mix, T7 Polymerase, für 3 h bei 37°C. Anschließend wurde ein DNase-Verdau mit DNase I (0,02 U/μl DNase I) für 15 min bei 37°C durchgeführt und die RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung aufgereinigt. Die Translation wurde mit Weizenkeim-Extrakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 2 μg RNA für 3 min bei 67°C erhitzt und dann sofort auf Eis herunter gekühlt. Nach Zugabe des Reaktionsansatzes (10 μl Weizenkeim-Extrakt, 0,8 μl aa-Mix ohne Methionin, 0,8 μl aa-Mix ohne Leucin, 0,4 μl RNasin) wurde die Translation für 1,5 h im Wasserbad bei 25°C in Glasgefäßen durchgeführt. 5 μl Translationsansatz wurden mit 20 μl Proteinladepuffer (50 mM Tris-HCl pH6,8; 2% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 100 mM DTT) versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und für einen Western Blot eingesetzt.

5.7.8 Methoden mit Proteinen

5.7.8.1 Herstellung von Proteinextrakt

Der Proteinextrakt wurde aus HUVEC oder HeLa-Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 75 μl Lyse-Puffer für 12-*well*-Platten (100 μl für 60 mm Schalen) für 20 min auf Eis lysiert. Die Zellen bzw. das Zelllysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit dem Proteinextrakt wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, dann wurde er mit 4x PAP versetzt und bei -20°C gelagert.

5.7.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Bradford-Tests¹⁶⁷. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Somit kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung gesehen werden. Um die gemessenen Absorptionswerte einordnen zu können, wurde eine Eichgerade mit bekannter Proteinkonzentration von BSA erstellt. Die Eichgerade wurde mit 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 und 20 μg BSA erstellt, die angegebenen Mengen wurden in 800 μl MQ verdünnt und je 200 μl des Bradford-Reagenz zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Von den Proteinextrakten wurden je 3-5 μl eingesetzt und in 800 μl MQ verdünnt und dazu je 200 μl Bradford-Reagenz gegeben und wiederum die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der Geradengleichung konnte die Konzentration des Proteinextrakts bestimmt werden. Die Messung wurde in 3fach-Bestimmung durchgeführt.

5.7.8.3 Western Blot

Die Proteinproben wurden mit 4x PAP versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf RT abgekühlt. Je 10-20 µg/Spur wurden auf ein vorgegossenes Gradientengel (Mini Protean TGX Precast Gel, Any kD) geladen und bei 150-180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurden je 5 µl des Precision Plus All Blue mitgeführt. Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit Hilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems auf eine PVDF-Membran überführt. Dabei erfolgte der Transfer in der Fast-Blot-Apparatur für Proteine <25 kDa für 5 min, für Proteine >25 kDa für 7 min. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in 2% (w/v) Blockier-Reagenz (ECL Prime Blocking Agent) in 1x TBST blockiert. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Erstantikörper (gelöst in Blockier-Reagenz) für 1-3 h bei RT inkubiert. Nach 3maligem Waschen in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper (gelöst in Blockier-Reagenz) für 1 h bei RT. Die Membran wurde 3mal in 1x TBST gewaschen und anschließend mit ECL Substrat entwickelt. Dazu wurde das ECL System von BioRad bzw. für schwache Signale das ECL Select System (Life technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Die Membran wurde für 5 min mit Substrat (1:1 gemischt) überschichtet und über das ChemiDoc™ MP System (BioRad) ausgelesen und mit Hilfe der Image Lab Software quantifiziert, falls erwünscht. Die Lagerung der Membran erfolgte in 1x TBST bei 4°C.

5.7.9 RNA-Protein-Interaktionen (Pulldown)

5.7.9.1 In vitro Transkription

Um RNA *in vitro* zu synthetisieren, wurde ein Templat unter Kontrolle des T7 Promotors verwendet. Für längere Fragmente (>100 bp) wurde mit *HindIII* linearisierter pHdV eingesetzt, welcher nach der Linearisierung durch Phenolisierung aufgereinigt wurde. Für kürzere Fragmente wurde das Templat durch eine PCR-Reaktion oder das Hybridisieren zweier Oligonukleotide hergestellt und durch Ethanolfällung aufgereinigt. Für eine 1 ml Transkription wurden ca. 50 pmol Plasmid oder ca. 500 pmol PCR-Produkt oder hybridisierte Oligonukleotide eingesetzt. Die Transkription erfolgte bei 37°C über Nacht unter folgenden Bedingungen: 200 mM Tris-Cl pH 8,0, 20 mM Mg(Ac)₂, 50 mM DTT, 2 mM Spermidin, je 4 mM NTP und 2 µg T7 RNA-Polymerase. Die RNA wurde aus einem denaturierenden PAA-Gel ausgeschnitten (Kapitel 5.7.3.5) und über Nacht in 300 mM NaAc pH 6,5 eluiert und anschließend mit Ethanol gefällt (Kapitel 5.7.3.6).

5.7.9.2 Biotinylieren von Nukleinsäuren

In vitro transkribierte RNA wurde am 5' Ende mit Biotin markiert, um damit anschließend einen Pulldown-Assay durchzuführen. Um die RNA am 5' Ende zu dephosphorylieren, wurden 600 pmol RNA mit Antarktischer Phosphatase in einem 10 µl Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von γ-S-ATP (2 mM) und T4 Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C in einem Volumen von 20 µl wurde eine Thiophosphatgruppe am 5' Ende der RNA eingebaut. Durch Zugabe von 10 µl Biotin (Long Arm) Maleimide für 30 min bei 65°C erfolgte die Kopplung von Biotin an die Thiolgruppe der RNA. Die RNA wurde mit Lithiumchlorid gefällt (Kapitel 5.7.3.6) und in 20 µl MQ gelöst.

5.7.9.3 Proteinextrakt für Biotin-RNA-Pulldown

Der Proteinextrakt für den Pulldown wurde frisch hergestellt, dazu wurden unbehandelte HeLa-Zellen verwendet. Die T75-Flaschen wurden abtrypsiniert wie in Kapitel 5.7.2.2 beschrieben. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert und mit 5 ml 1x PBS pro T75 Flasche gewaschen. Die Zellen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Die Lyse erfolgte in 1x RIB mit 0,5% Igepal-630, Ribolock (2,5 µl/ml), Phosphatase-Inhibitor (50 µl/ml) und PIC (5 µl/ml). Das Zellpellet wurde in 100 µl 1x RIB resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach 30minütigem Auftauen auf Eis wurde für 10 min bei 13300 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration durch Bradford-Test (Kapitel 5.7.8.2) bestimmt. Dazu wurde der Proteinextrakt 1:10 in Lyse-Puffer verdünnt. Der Proteinextrakt wurde bis zur Verwendung auf Eis inkubiert.

5.7.9.4 Biotin-RNA-Pulldown

Für den Biotin-RNA-Pulldown werden Low-Binding Reaktionsgefäße verwendet. Pro Reaktion wurden 100 µl Streptavidin-Dynabeads verwendet, die durch 5maliges Waschen in je 1 ml 1x RIB vorbereitet wurden. Dann wurden 200 pmol biotinylierte RNA (Kapitel 5.7.9.2) in 500 µl 1x RIB (+ Ribolock) auf die Dynabeads gegeben und für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Pro Reaktion wurde 1 mg HeLa-Proteinlysate (Kapitel 5.7.9.3) in 500 µl 1x RIB (+ Ribolock) zugegeben und 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für weitere 15 min bei RT. Dann wurden die Dynabeads 5mal in 1x RIB (mit Ribolock) gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in 30 µl 4x PAP aufgenommen. Die Dynabeads wurden für 10 min bei 95°C aufgekocht, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser für Western Blot eingesetzt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 6.1 Abkürzungen

Abkürzungen		Abkürzungen (Fortsetzung)	
3'	3' OH-Ende	MCS	<i>multiple cloning site</i>
5'	5' Phosphat-Ende	MQ	Millipore-Wasser
aa	Aminosäure	mRNA	<i>messenger RNA</i>
Amp	Ampicillin	NaAc	Natriumacetat
Amp ^R	Ampicillinresistenz	NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
AS	alternatives Spleißen	nt	Nukleotid
ATP	Adenosintriphosphat	oDx	optische Dichte bei x nm
bp	Basenpaar	ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
BP	Verzweigungspunkt (<i>branch point</i>)	ORI	<i>origin of replication</i>
bzw.	beziehungsweise	PAA	Polyacrylamid
BSA	Rinder-Serum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
ca.	circa	PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
cDNA	<i>complementary DNA</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
CDS	Protein kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)	prä-mRNA	<i>precursor messenger RNA</i>
CFU	Kolonieformende Einheiten (<i>colony forming units</i>)	Prom	Promotor
CHX	Cycloheximid	PTC	vorzeitiges Stopcodon (<i>premature termination codon</i>)
CLIP	<i>cross-linking and immunoprecipitation</i>	qPCR	quantitative RT-PCR
CMV	Cytomegalievirus	RBD	RNA bindende Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	rev	<i>reverse</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RRM	<i>RNA recognition motif</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
ds	doppelsträngig	RT	reverse Transkription
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
EBM	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	ss	einzelsträngig
<i>et al.</i>	et alii (lat.: „und andere“)	SS	Spleißstelle
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>	SV40	Simian-Virus 40
ESS	<i>exonic splicing silencer</i>	TE	Trypsin-EDTA
EtOH	Ethanol	u.a.	unter anderem
FCS	<i>fetal calf serum</i>	ün	über Nacht
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)	ÜNK	Übernachtkultur
gDNA	genomische DNA	ÜTK	Übertagkultur
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	UTR	nicht translatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
ISE	<i>intronic splicing enhancer</i>	Vgl.	Vergleich
ISS	<i>intronic splicing silencer</i>	Vol.	Volumen
lat.	lateinisch	z.B.	zum Beispiel
LB	<i>lysogeny broth</i>		

Tabelle 6.2 Einheiten

Einheiten	
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
Mol	Stoffmenge (6,022 x 10 ²³ Teilchen)
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
V	Volt
v/v	volume per volume
W	Watt
w/v	weight per volume

Tabelle 6.3 Dimensionen

Vorsätze für Maßeinheiten		
k	Kilo	10 ³
m	Milli	10 ⁻³
μ	Mikro	10 ⁻⁶
n	Nano	10 ⁻⁹
p	Pico	10 ⁻¹²

Tabelle 6.4 Nukleobasen

Nukleobasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
N	A, C, G, T, U

Tabelle 6.5 Aminosäuren

Aminosäuren	
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin

Aminosäuren (Fortsetzung)	
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7 Literaturverzeichnis

1. Semenza, G.L. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* **365**, 537-47 (2011).
2. Silbernagl, S. & Despopoulos, A. Taschenatlas Physiologie (Thieme, Stuttgart u.a., 2007).
3. Dunwoodie, S.L. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell* **17**, 755-73 (2009).
4. Li, W. et al. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *Embo j* **26**, 1221-33 (2007).
5. Parathath, S., Yang, Y., Mick, S. & Fisher, E.A. Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages. *Trends Cardiovasc Med* **23**, 80-4 (2013).
6. Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J. & Pouyssegur, J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* **85**, 1301-7 (2007).
7. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T. & Carmeliet, P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell* **16**, 167-79 (2009).
8. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-87 (2011).
9. Toffoli, S. & Michiels, C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J* **275**, 2991-3002 (2008).
10. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **88**, 1474-80 (2000).
11. Carroll, V.A. & Ashcroft, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med* **7**, 1-16 (2005).
12. Galban, S. et al. RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* **28**, 93-107 (2008).
13. Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H. & Levy, A.P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* **273**, 6417-23 (1998).
14. Gorospe, M., Tominaga, K., Wu, X., Fahling, M. & Ivan, M. Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs. *Front Mol Neurosci* **4**, 7 (2011).
15. Coles, L.S. et al. A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* **271**, 648-60 (2004).
16. Kim, T.W. et al. Tristetraprolin regulates the stability of HIF-1alpha mRNA during prolonged hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 963-8 (2010).
17. Bermudez, O. et al. Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. *J Cell Physiol* **226**, 276-84 (2011).
18. Fasanaro, P. et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* **283**, 15878-83 (2008).
19. Hua, Z. et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One* **1**, e116 (2006).
20. Will, C.L. & Luhrmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3** (2011).
21. Berget, S.M. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* **270**, 2411-4 (1995).
22. De Conti, L., Baralle, M. & Buratti, E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 49-60 (2013).

23. Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. & Blencowe, B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40**, 1413-5 (2008).
24. Wang, E.T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-6 (2008).
25. Kelemen, O. et al. Function of alternative splicing. *Gene* **514**, 1-30 (2013).
26. Roy, B., Haupt, L.M. & Griffiths, L.R. Review: Alternative Splicing (AS) of Genes As An Approach for Generating Protein Complexity. *Curr Genomics* **14**, 182-94 (2013).
27. McManus, C.J. & Graveley, B.R. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 373-9 (2011).
28. Gooding, C. et al. A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones. *Genome Biol* **7**, R1 (2006).
29. Chen, M. & Manley, J.L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 741-54 (2009).
30. Howard, J.M. & Sanford, J.R. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**, 93-110 (2015).
31. Krecic, A.M. & Swanson, M.S. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 363-71 (1999).
32. Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-2 (1992).
33. Lau, J.S. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter. *J Cell Biochem* **79**, 395-406 (2000).
34. Hamilton, B.J., Burns, C.M., Nichols, R.C. & Rigby, W.F. Modulation of AUUUA response element binding by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in human T lymphocytes. The roles of cytoplasmic location, transcription, and phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 28732-41 (1997).
35. Michael, W.M., Choi, M. & Dreyfuss, G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-22 (1995).
36. Bonnal, S. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem* **280**, 4144-53 (2005).
37. Erkelenz, S. et al. Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* **19**, 96-102 (2013).
38. Matlin, A.J., Clark, F. & Smith, C.W. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 386-98 (2005).
39. Kurosaki, T. & Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* **129**, 461-7 (2016).
40. Nicholson, P. et al. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci* **67**, 677-700 (2010).
41. Nagy, E. & Maquat, L.E. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* **23**, 198-9 (1998).
42. Hillman, R.T., Green, R.E. & Brenner, S.E. An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol* **5**, R8 (2004).
43. Green, R.E. et al. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* **19 Suppl 1**, i118-21 (2003).

-
44. Wittmann, J., Hol, E.M. & Jack, H.M. hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* **26**, 1272-87 (2006).
 45. Pan, Q. et al. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* **20**, 153-8 (2006).
 46. Lareau, L.F., Inada, M., Green, R.E., Wengrod, J.C. & Brenner, S.E. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**, 926-9 (2007).
 47. Saltzman, A.L. et al. Regulation of multiple core spliceosomal proteins by alternative splicing-coupled nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* **28**, 4320-30 (2008).
 48. Ni, J.Z. et al. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* **21**, 708-18 (2007).
 49. Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. & Soret, J. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J* **20**, 1785-96 (2001).
 50. Lejeune, F., Cavaloc, Y. & Stevenin, J. Alternative splicing of intron 3 of the serine/arginine-rich protein 9G8 gene. Identification of flanking exonic splicing enhancers and involvement of 9G8 as a trans-acting factor. *J Biol Chem* **276**, 7850-8 (2001).
 51. Jumaa, H. & Nielsen, P.J. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J* **16**, 5077-85 (1997).
 52. Stoilov, P., Daoud, R., Nayler, O. & Stamm, S. Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet* **13**, 509-24 (2004).
 53. Wilson, G.M. et al. Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* **19**, 4056-64 (1999).
 54. McGlincy, N.J. et al. Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay. *BMC Genomics* **11**, 565 (2010).
 55. Spellman, R., Llorian, M. & Smith, C.W. Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol Cell* **27**, 420-34 (2007).
 56. Rossbach, O. et al. Auto- and cross-regulation of the hnRNP L proteins by alternative splicing. *Mol Cell Biol* **29**, 1442-51 (2009).
 57. David, C.J. & Manley, J.L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* **24**, 2343-64 (2010).
 58. Chabot, B. & Shkreta, L. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J Cell Biol* **212**, 13-27 (2016).
 59. Blencowe, B.J. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37-47 (2006).
 60. Zielenski, J. & Tsui, L.C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* **29**, 777-807 (1995).
 61. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. & Wirth, B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6307-11 (1999).
 62. Hua, Y. et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* **478**, 123-6 (2011).
 63. Spitalli, P. & Aartsma-Rus, A. Splice modulating therapies for human disease. *Cell* **148**, 1085-8 (2012).
 64. Das, S. & Krainer, A.R. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res* **12**, 1195-204 (2014).

-
65. Goncalves, V. & Jordan, P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. *Biomed Res Int* **2015**, 287048 (2015).
 66. Tsuchiya, N., Kamei, D., Takano, A., Matsui, T. & Yamada, M. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein and its expression in myeloid leukemia cells. *J Biochem* **123**, 499-507 (1998).
 67. Kamei, D., Tsuchiya, N., Yamazaki, M., Meguro, H. & Yamada, M. Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPDL). *Gene* **228**, 13-22 (1999).
 68. Kawamura, H. et al. Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J Biol Chem* **277**, 2732-9 (2002).
 69. Wu, Y.Y. et al. Overexpression of JKTBP1 induces androgen-independent LNCaP cell proliferation through activation of epidermal growth factor-receptor (EGF-R). *Cell Biochem Funct* **26**, 467-77 (2008).
 70. Zhou, H. et al. Growth arrest specific 2 is up-regulated in chronic myeloid leukemia cells and required for their growth. *PLoS One* **9**, e86195 (2014).
 71. Vieira, N.M. et al. A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). *Hum Mol Genet* **23**, 4103-10 (2014).
 72. Reboll, M.R. et al. NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-nt RNA element. *Rna* **13**, 1328-40 (2007).
 73. Omnus, D.J. et al. JKTBP1 is involved in stabilization and IRES-dependent translation of NRF mRNAs by binding to 5' and 3' untranslated regions. *J Mol Biol* **407**, 492-504 (2011).
 74. Nourbakhsh, M. & Hauser, H. Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *EMBO J* **18**, 6415-25 (1999).
 75. Nourbakhsh, M. et al. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J Biol Chem* **276**, 4501-8 (2001).
 76. Feng, X. et al. Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (hiNOS) promoter: The role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the hiNOS gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14212-7 (2002).
 77. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-50 (2002).
 78. Li, X., Johansson, C., Glahder, J., Mossberg, A.K. & Schwartz, S. Suppression of HPV-16 late L1 5'-splice site SD3632 by binding of hnRNP D proteins and hnRNP A2/B1 to upstream AUAGUA RNA motifs. *Nucleic Acids Res* **41**, 10488-508 (2013).
 79. Akagi, T. et al. Molecular characterization of a mouse heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its tissue-specific expression. *Gene* **245**, 267-73 (2000).
 80. Boopathi, E. et al. Regulation of murine cytochrome c oxidase Vb gene expression during myogenesis: YY-1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BERF-1/ZBP-89 factor. *J Biol Chem* **279**, 35242-54 (2004).
 81. Wang, Y. et al. A complex network of factors with overlapping affinities represses splicing through intronic elements. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 36-45 (2013).
 82. Kamei, D. & Yamada, M. Interactions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its domains with high-affinity binding sites. *Gene* **298**, 49-57 (2002).
 83. Lal, A. et al. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *Embo j* **23**, 3092-102 (2004).

-
84. Hang, X. et al. Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. *BMC Genomics* **10**, 126 (2009).
 85. Kemmerer, K. Analyse von RNA-Sekundärstrukturelementen in nichtkodierenden Bereichen. Diplomarbeit. (Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2011).
 86. Gaber, T. et al. Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *J Rheumatol* **36**, 2655-69 (2009).
 87. Geiger, K. et al. Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *PLoS One* **6**, e26465 (2011).
 88. Scheurer, S.B., Rybak, J.N., Rosli, C., Neri, D. & Elia, G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* **4**, 1737-60 (2004).
 89. Mirtschink, P. et al. HIF-driven SF3B1 induces KHK-C to enforce fructolysis and heart disease. *Nature* **522**, 444-9 (2015).
 90. Sena, J.A., Wang, L., Heasley, L.E. & Hu, C.J. Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes. *Mol Cancer Res* **12**, 1233-43 (2014).
 91. Hu, X. et al. Severe hypoxia exerts parallel and cell-specific regulation of gene expression and alternative splicing in human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* **15**, 303 (2014).
 92. Weigand, J.E., Boeckel, J.N., Gellert, P. & Dimmeler, S. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One* **7**, e42697 (2012).
 93. Diolaiti, D., McFerrin, L., Carroll, P.A. & Eisenman, R.N. Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 484-500 (2015).
 94. Berberich, S.J. & Cole, M.D. Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers. *Genes Dev* **6**, 166-76 (1992).
 95. Comino-Mendez, I. et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet* **43**, 663-7 (2011).
 96. Romero, O.A. et al. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov* **4**, 292-303 (2014).
 97. Gregory, M.A. & Hann, S.R. c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* **20**, 2423-35 (2000).
 98. Blackwood, E.M., Luscher, B. & Eisenman, R.N. Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* **6**, 71-80 (1992).
 99. Berenguer, J. et al. MicroRNA 22 regulates cell cycle length in cerebellar granular neuron precursors. *Mol Cell Biol* **33**, 2706-17 (2013).
 100. Gastaldi, C. et al. miR-193b/365a cluster controls progression of epidermal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **35**, 1110-20 (2014).
 101. Ting, Y., Medina, D.J., Strair, R.K. & Schaar, D.G. Differentiation-associated miR-22 represses Max expression and inhibits cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 606-11 (2010).
 102. Zhang, H., Fan, S. & Prochownik, E.V. Distinct roles for MAX protein isoforms in proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17416-24 (1997).
 103. Makela, T.P., Koskinen, P.J., Vastrik, I. & Alitalo, K. Alternative forms of Max as enhancers or suppressors of Myc-ras cotransformation. *Science* **256**, 373-7 (1992).
 104. Vastrik, I., Koskinen, P.J., Alitalo, R. & Makela, T.P. Alternative mRNA forms and open reading frames of the max gene. *Oncogene* **8**, 503-7 (1993).

-
105. Talwar, S. et al. Caspase-mediated cleavage of RNA-binding protein HuR regulates c-Myc protein expression after hypoxic stress. *J Biol Chem* **286**, 32333-43 (2011).
 106. Huang, L.E. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ* **15**, 672-7 (2008).
 107. March, J.C., Rao, G. & Bentley, W.E. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 303-15 (2003).
 108. Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* **12**, 1035-40 (1999).
 109. Larkin, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8 (2007).
 110. Karolchik, D. et al. The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res* **31**, 51-4 (2003).
 111. Rothrock, C., Cannon, B., Hahm, B. & Lynch, K.W. A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45. *Mol Cell* **12**, 1317-24 (2003).
 112. Majewski, J. & Ott, J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res* **12**, 1827-36 (2002).
 113. White, E.J., Brewer, G. & Wilson, G.M. Post-transcriptional control of gene expression by AUF1: mechanisms, physiological targets, and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 680-8 (2013).
 114. Babic, I. et al. EGFR mutation-induced alternative splicing of Max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. *Cell Metab* **17**, 1000-8 (2013).
 115. Bruno, I.G. et al. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell* **42**, 500-10 (2011).
 116. McGlincy, N.J. & Smith, C.W. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* **33**, 385-93 (2008).
 117. de Lima Morais, D.A. & Harrison, P.M. Large-scale evidence for conservation of NMD candidature across mammals. *PLoS One* **5**, e11695 (2010).
 118. Galante, P.A., Sakabe, N.J., Kirschbaum-Slager, N. & de Souza, S.J. Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. *RNA* **10**, 757-65 (2004).
 119. Braunschweig, U. et al. Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Res* **24**, 1774-86 (2014).
 120. Wong, J.J. et al. Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell* **154**, 583-95 (2013).
 121. Yap, K., Lim, Z.Q., Khandelia, P., Friedman, B. & Makeyev, E.V. Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. *Genes Dev* **26**, 1209-23 (2012).
 122. Lykke-Andersen, J. & Bennett, E.J. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J Cell Biol* **204**, 467-76 (2014).
 123. Wojcik, C. & DeMartino, G.N. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 579-89 (2003).
 124. Glickman, M.H. Getting in and out of the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 149-58 (2000).
 125. Takeuchi, J., Chen, H., Hoyt, M.A. & Coffino, P. Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem J* **410**, 401-7 (2008).
 126. Zhang, M., Pickart, C.M. & Coffino, P. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *EMBO J* **22**, 1488-96 (2003).
 127. Rubinsztein, D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780-6 (2006).

-
128. Wang, R. & Brattain, M.G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett* **581**, 3164-70 (2007).
129. Li, X. et al. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* **273**, 34970-5 (1998).
130. Hoyt, M.A., Zhang, M. & Coffino, P. Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fungal cells. *J Biol Chem* **278**, 12135-43 (2003).
131. DeScenzo, R.A. & Minocha, S.C. Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol Biol* **22**, 113-27 (1993).
132. Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B., Mercer, W.E. & Hall, D.J. A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J Biol Chem* **274**, 8299-308 (1999).
133. Bardot, B. et al. Mice engineered for an obligatory Mdm4 exon skipping express higher levels of the Mdm4-S isoform but exhibit increased p53 activity. *Oncogene* **34**, 2943-2948 (2015).
134. Bardot, B. & Toledo, F. Mdm4: don't judge an isoform by its mRNA levels! *Aging (Albany NY)* **7**, 744-5 (2015).
135. Hao, Y. et al. Semi-supervised Learning Predicts Approximately One Third of the Alternative Splicing Isoforms as Functional Proteins. *Cell Rep* **12**, 183-9 (2015).
136. van Riggelen, J., Yetil, A. & Felsher, D.W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* **10**, 301-9 (2010).
137. Zhong, H. & Simons, J.W. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 523-6 (1999).
138. Bouchard, C. et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* **15**, 2042-7 (2001).
139. Zhao, H. & Xu, Y.H. mad-overexpression down regulates the malignant growth and p53 mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells. *Cell Res* **9**, 51-59 (1999).
140. Lin, C.J., Cencic, R., Mills, J.R., Robert, F. & Pelletier, J. c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer Res* **68**, 5326-34 (2008).
141. Hirschfeld, M. et al. Hypoxia-dependent mRNA expression pattern of splicing factor YT521 and its impact on oncological important target gene expression. *Mol Carcinog* **53**, 883-92 (2014).
142. Voellenkle, C. et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA* **18**, 472-84 (2012).
143. Amin, D.N., Hida, K., Bielenberg, D.R. & Klagsbrun, M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* **66**, 2173-80 (2006).
144. Anczuków, O. et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 220-228 (2012).
145. Wang, Y. et al. The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell* **26**, 374-89 (2014).
146. Wollerton, M.C., Gooding, C., Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A. & Smith, C.W. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* **13**, 91-100 (2004).
147. Avendano-Vazquez, S.E. et al. Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection. *Genes Dev* **26**, 1679-84 (2012).

-
148. Motta-Mena, L.B., Heyd, F. & Lynch, K.W. Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L. *Mol Cell* **37**, 223-34 (2010).
 149. Yang, J. et al. RBM24 is a major regulator of muscle-specific alternative splicing. *Dev Cell* **31**, 87-99 (2014).
 150. Huelga, S.C. et al. Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep* **1**, 167-78 (2012).
 151. Smith, S.A. et al. Paralogs hnRNP L and hnRNP LL exhibit overlapping but distinct RNA binding constraints. *PLoS One* **8**, e80701 (2013).
 152. Topp, J.D., Jackson, J., Melton, A.A. & Lynch, K.W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. *RNA* **14**, 2038-49 (2008).
 153. Yoon, J.H. et al. PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity. *Nat Commun* **5**, 5248 (2014).
 154. Zucconi, B.E. et al. Alternatively expressed domains of AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) regulate RNA-binding affinity, RNA-induced protein oligomerization, and the local conformation of bound RNA ligands. *J Biol Chem* **285**, 39127-39 (2010).
 155. Banihashemi, L., Wilson, G.M., Das, N. & Brewer, G. Upf1/Upf2 regulation of 3' untranslated region splice variants of AUF1 links nonsense-mediated and A+U-rich element-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* **26**, 8743-54 (2006).
 156. Hung, L.H. et al. Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA* **14**, 284-96 (2008).
 157. Coutinho-Mansfield, G.C., Xue, Y., Zhang, Y. & Fu, X.D. PTB/nPTB switch: a post-transcriptional mechanism for programming neuronal differentiation. *Genes Dev* **21**, 1573-7 (2007).
 158. Xin, H. et al. Association of the von Hippel-Lindau protein with AUF1 and posttranscriptional regulation of VEGFA mRNA. *Mol Cancer Res* **10**, 108-20 (2012).
 159. Panda, A.C. et al. RNA-binding protein AUF1 promotes myogenesis by regulating MEF2C expression levels. *Mol Cell Biol* **34**, 3106-19 (2014).
 160. Theiss, C. Untersuchung des alternativen Spleißens von HNRPD L unter Sauerstoffmangel, Bachelor Thesis. (Technische Universität Darmstadt, 2015).
 161. Sambrook, J. Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell (eds. Russell, D.W. & Cold Spring Harbor, L.) (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).
 162. Berens, C. et al. Subtype selective tetracycline agonists and their application for a two-stage regulatory system. *Chembiochem* **7**, 1320-4 (2006).
 163. Beilstein, K., Wittmann, A., Grez, M. & Suess, B. Conditional control of mammalian gene expression by tetracycline-dependent hammerhead ribozymes. *ACS Synth Biol* **4**, 526-34 (2015).
 164. Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80 (1983).
 165. Invitrogen. in K6010–01, K6010–02 (ed. E, V.) (2010).
 166. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
 167. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
 168. Mazan-Mamczarz, K. et al. Identification of a signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein AUF1. *Nucleic Acids Res* **37**, 204-14 (2009).

8 Lebenslauf

Name	Katrin Kemmerer geboren am 02.03.1986 in Hanau
Adresse	In den Heimerswiesen 9 63457 Hanau
Schulausbildung	
1996-2006	Hohe Landesschule, Hanau Abschluss: Abitur
Hochschulausbildung	
Seit 2012	Promotionsstudium an der Technischen Universität Darmstadt, Deutschland im Labor von Prof. Dr. Beatrix Süß Titel der Dissertation: Alternatives Spleißen unter Hypoxie in humanen Endothelzellen Angestrebter Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften (Doctor rerum naturalium)
2010-2011	Diplomarbeit an der Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland Titel der Abschlussarbeit: Analyse von RNA-Sekundärstrukturelementen in nichtkodierenden Bereichen
2006-2011	Biologie-Studium an der Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland Vertiefung in Mikrobiologie, Biochemie, Genetik Abschluss: Diplom Biologie
Mitgliedschaften	
Seit 2012	Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie
Seit 2009	Biotechnologische Studenteninitiative

Hanau, den 01.04.2016

9 Publikationen und Tagungen

Publikationen

Kemmerer, K. & Weigand, J.E.

Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing. *FEBS Lett* 588, 4784-90 (2014).

Kemmerer K., Weigand, J.E. and Suess B.

Synthetic Splicing and Alternative Splicing - Impact on Gene Design. *WILEY BIOTECHNOLOGY SERIE*
akzeptiert

Vorträge und Posterbeiträge

Winterschule des SFB902 (2013); Obergurgl, Österreich

Vortrag: Alternative Splicing in Hypoxia

Symposium „Molecular machines in RNA processing, translation and transport“ (2013); Göttingen, Deutschland

Posterpräsentation: Alternative splicing of the sptan1 gene in endothelial cells

RNA-Club (2013); Frankfurt am Main, Deutschland (Moderation)

Winterschule des SFB902 (2014); Obergurgl, Österreich

Vortrag: Regulation of alternative splicing – the RNA binding protein HNRPDL

32. Rabensteiner Kolleg (2014); Pottenstein, Deutschland

Vortrag: MAX Isoform Expression wird durch RNA und Protein Determinanten bestimmt

RNA Biochemistry Meeting (2014); Bonn, Deutschland

Vortrag: Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing

RNA-Club (2015); Frankfurt am Main, Deutschland

Vortrag: Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing

EMBO Conference Series “Protein synthesis and translational control” (2015); Heidelberg, Deutschland

Posterpräsentation: Alternative Splicing of the RNA Binding Protein HNRPDL

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sowie sämtliche von anderen direkt oder indirekt übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Hanau, den ____ . ____ . ____

.....

Katrin Kemmerer